

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE**

XVI Ciclo – 2001 - 2005

COORDINATORE: PROF. GIANNI MARONE

TESI DI DOTTORATO

**ATTIVAZIONE DEI BASOFILI E DEI MASTOCITI UMANI DA
PARTE DELLE GLICOPROTEINE Gp120 E Gp41 E DI TAT DEL
VIRUS HIV-1**

**TUTORE
Prof. Gianni Marone**

**CANDIDATO
Dr. Giovanni Florio**

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**

XVI Ciclo – 2001 - 2005

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

Tesi di Dottorato

ATTIVAZIONE DEI BASOFILI E DEI MASTOCITI

UMANI DA PARTE DELLE GLICOPROTEINE

Gp120 E Gp41 E DI TAT DEL VIRUS HIV-1

TUTORE
Prof. Gianni Marone

CANDIDATO
Dr. Giovanni Florio

INDICE

Introduzione	pag. 4
Materiali e metodi	16
Reagenti	16
Buffers	18
Purificazione dei basofili umani dal sangue periferico	19
Purificazione dei mastociti polmonari e cutanei	20
Analisi citofluorimetrica delle molecole di superficie	21
IgM Monoclonali umane	22
Dosaggio del rilascio di istamina e citochine	22
Chemiotassi delle cellule FcεRI ⁺	23
Determinazione del Ca ⁺⁺ intracellulare	25
Isolamento dell'mRNA, RT-PCR e PCR Quantitativa	26
Analisi Statistiche	28
Discussione	29
Gp120 Induce la Sintesi e la Secrezione di IL-4 e IL-13 dai Basofili Umani	29
Effetto di gp120 da Diversi HIV-1 di Diverse Cladi Virali	30
La Ciclosporina A ed il Tacrolimus Inibiscono la Secrezione di IL-4 Indotta da gp120 nei Basofili Umani	31
Lo Stipping delle IgE Inibisce il Rilascio di IL-4 e di IL-13 Indotto da gp120 nei Basofili Umani	33
Specificità di Interazione tra gp120 ed IgE	33
Effetti dei Peptidi Sintetici di gp120 _{MN} sul Rilascio di IL-4 Indotto da gp120 _{MN}	35
Effetti dei peptidi della gp41 sul rilascio di istamina e citochine dai basofili umani	36
Cross-desensibilizzazione tra i peptidi della gp41 di HIV-1 e l'FMLP	37
Effetti dei peptidi della gp41 di HIV-1 sul rilascio di istamina dai basofili indotto dall'anti IgE	38

L'interazione dei peptidi della gp41 con FMLP induce il rilascio di istamina dai basofili	38
Effetti del peptide 2021 sulla sintesi di mRNA per IL-13 nei basofili mediato da FMLP	39
Effetti di 2019 e 2021 sul rilascio di IL-13 nei basofili indotto da FMLP	40
Effetti della CsH sulla chemiotassi indotta dai peptidi della gp41 e dall'FMLP	40
Effetti di Tat sulla chemiotassi dei basofili umani	41
Effetti di Tat sulla mobilizzazione del Ca^{++} intracellulare nei basofili	42
La chemiotassi dei basofili indotta da Tat è mediata dall'interazione della proteina con CCR3	43
 Conclusioni	 45
 Bibliografia	 61
 Legenda delle figure	 87
 Figure	 110
 Tabelle	 137

INTRODUZIONE

La glicoproteina dell'envelope del virus dell'immunodeficienza umana tipo 1 (HIV-1) è sintetizzata come precursore gp160 che, successivamente, subisce un clivaggio per opera di proteinasi dando luogo alle due glicoproteine gp120 e gp41 (Kowalski *et al.*, 1987). Diverse cladi di HIV-1, identificate da pazienti sieropositivi provenienti da diverse aree geografiche, sintetizzano diversi tipi di gp120. La gp120 gioca un ruolo centrale nell'infezione da HIV-1 attraverso il legame con la glicoproteina CD4 delle cellule immunocompetenti (Fauci, 1996; Kwong *et al.*, 1998). Attraverso il legame con il CD4, gp120 va incontro ad alterazioni conformazionali che ne permettono l'interazione con diversi recettori (CCR5, CXCR4, CCR3, etc.) per le chemochine espressi sui T linfociti umani e sui macrofagi (Dragic *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996; Ostrowski *et al.*, 1998).

L'interazione con i co-recettori induce ulteriori modificazioni conformazionali nelle proteine dell'envelope e la conseguente

esposizione di un dominio di fusione idrofobico della subunità transmembrana della gp41 che è responsabile della fusione delle membrane del virus con la cellula bersaglio (Moore, 1997).

E' stato documentato che i T linfociti umani CD4⁺ producono una risposta funzionalmente polarizzata basata sul profilo delle citochine rilasciate (Abbas *et al.*, 1996). I linfociti T_H1 producono IFN- γ e IL-2, mentre i T_H2 producono in prevalenza IL-4, IL-5 e IL-13 (Del Prete *et al.*, 1988). Le citochine prodotte dai linfociti T_H2 sono state associate ad un aumento della produzione delle IgE (Lucey *et al.*, 1990; Shor-Posner *et al.*, 1995). I livelli sierici di IgE risultano elevati in bambini ed adulti con infezione da HIV-1 (Lucey *et al.*, 1990; Paganelli *et al.*, 1995; Shor-Posner *et al.*, 1995; Koutsonikolis *et al.*, 1996; Secord *et al.*, 1996) e un aumento dei livelli di IgE è stato associato ad una progressione della malattia da HIV-1 (Lucey *et al.*, 1990; Shor-Posner *et al.*, 1995). Dunque, il livello delle IgE è un marker di prognosi peggiore negli stadi iniziali della infezione da HIV-1 (Israël-Biet *et al.*, 1992; Viganò *et al.*, 1995; Rancinan *et al.*, 1998).

Clerici e collaboratori hanno prospettato che, durante le fasi precoci dell'infezione da HIV-1, vi sia una polarizzazione della produzione, da parte dei linfociti del sangue periferico, di citochine dal fenotipo T_H1 verso il fenotipo T_H2 (Clerici e Shearer, 1993, Clerici *et al.*, 1993). Tuttavia, Graziosi e collaboratori non hanno osservato la polarizzazione delle citochine di tipo T_H2 nei linfonodi di pazienti infettati da HIV-1 (Graziosi *et al.*, 1994); Maggi e collaboratori non hanno riscontrato una prevalenza delle citochine di tipo T_H2 in cloni di cellule T ottenute da individui con infezione HIV-1 durante la progressione verso l'AIDS (Maggi *et al.*, 1994). Questi autori hanno, tuttavia, osservato che HIV-1 si replica preferenzialmente in cloni T_H2 piuttosto che in cloni T_H1 (Maggi *et al.*, 1994; Rancinan *et al.*, 1998), questa ipotesi è, almeno in parte, ancora controversa (Kanagawa *et al.*, 1993; Morawetz *et al.*, 1994). Questi dati in apparente contrasto tra loro potrebbero essere dovuti a cause tecniche, alla produzione di citochine di tipo T_H2 da tipi cellulari diversi (ad esempio mastociti e basofili), alla stimolazione da parte di superantigeni virali o batterici o al ruolo svolto da citochine diverse dalla IL-4 (ad esempio la IL-13).

I basofili ed i mastociti sono le uniche cellule che nell'uomo esprimono costitutivamente i recettori ad alta affinità per le IgE (Fc_εRI) (Marone 1995a; 1995b; Marone *et al.*, 2000). Molti studi hanno dimostrato che le cellule Fc_εRI⁺ sono coinvolte nella difesa verso parassiti e verso le infezioni batteriche o virali (Florio *et al.*, 2000; Patella *et al.*, 2000). Numerose evidenze suggeriscono il possibile ruolo dei basofili e dei mastociti nell'infezione da HIV-1. Inoltre, i basofili (Brunner *et al.*, 1993; Ochensberger *et al.*, 1996) ed i mastociti (Bradding *et al.*, 1992; Burd *et al.*, 1995) immunologicamente attivati producono IL-4 e IL-13, due citochine chiave nell'induzione della risposta T_H2 (Abbas *et al.*, 1996). E' interessante sottolineare come i basofili ed i mastociti possano essere attivati da superantigeni che interagiscono con la regione V_H3 delle IgE di superficie. Ad esempio, la proteina Fv, un superantigene endogeno prodotto in pazienti con infezioni virali, induce la secrezione di IL-4 e di IL-13 dai basofili umani (Patella *et al.*, 1998). E' stato dimostrato che la glicoproteina gp120 di HIV-1 è un superantigene che interagisce con la regione V_H3 delle immunoglobuline inducendo un'attivazione policlonale dei B linfociti

(Karray and Zouali, 1997; Karray *et al.*, 1998). Inoltre, gli antigeni di HIV-1 inducono rilascio di istamina dai basofili umani (Pedersen *et al.*, 1991). Queste osservazioni nell'insieme suggeriscono una probabile interazione tra gp120 e cellule umane FcεRI⁺ (basofili e mastociti). Abbiamo studiato questa interazione e verificato l'ipotesi che la gp120 possa indurre sintesi e secrezione di IL-4 e di IL-13 dalle cellule FcεRI⁺ purificate da individui sani negativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2.

Molteplici studi indicano, inoltre, che gp41 esercita diversi effetti sul sistema immunitario. In particolare è stato dimostrato che la forma solubile della gp41 induce la sintesi di citochine proinfiammatorie (TNFα e IL-1) (Merrill *et al.*, 1992; Takeshita *et al.*, 1995) ed aumenta l'attività dell'ossido nitrico sintetasi nei fagociti mononucleati e nelle cellule della microglia (Adamson *et al.*, 1996). Inoltre è stato dimostrato che la gp41 è in grado di sopprimere la proliferazione dei linfociti (Chen *et al.*, 1995) e di favorire la risposta immune di tipo T_H2 inducendo preferenzialmente la produzione di IL-10 nei monociti (Koutsonikolis *et al.*, 1997). Molteplici evidenze indicano che la gp41 è un potente agente chemiotattico per i monociti

e per i neutrofili mediante l'interazione con una famiglia di recettori accoppiati a proteine G e specifici per un tripeptide formilato (N-formyl-metionil-leucil-fenilalanina, FMLP) (Su *et al.*, 1999; Su *et al.*, 1999a).

Diversi peptidi N-formilati, incluso l'FMLP, sono stati purificati da sovranatanti di colture batteriche, suggerendo che essi interagiscono con recettori espressi sulle cellule infiammatorie. FMLP attiva dei recettori appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline costituiti da sette domini transmembrana ed accoppiati a proteine G. Sono stati identificati e clonati tre recettori appartenenti a questa famiglia diversamente espressi sui leucociti umani. I neutrofili esprimono il recettore ad alta affinità (FPR) e il suo omologo FPR-like 1 (FPRL1) mentre i monociti esprimono FPR, FPRL-1 e FPR-like 2 (FPRL2) (Durstin *et al.*, 1994). FPR è il recettore ad alta affinità per l'FMLP; viceversa FPRL-1 ha una affinità minore (Gao *et al.*, 1994). FPRL-1 è un recettore promiscuo attivato dall'amiloide A (Su *et al.*, 1999b), dalla lipossina A₄ (Fiore *et al.*, 1994) e da molteplici peptidi di sintesi (Christophe *et al.*, 2001). La ciclosporina H e la spinorfina sono specifici antagonisti del recettore FPR (de Paulis *et al.*, 1996;

Wenzel-Seifert *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2001) e inibiscono la chemiotassi dei basofili indotta da FMLP.

Nessun agonista naturale di FPRL-2 è stato identificato.

Sono stati, dunque, valutati gli effetti dei peptidi sintetici (2017, 2019, 2020, 2021, 2023, 2027, 2029, 2030, 2031 e 2035) costituenti l'envelope di gp41 di HIV-1_{MN} sulla attivazione dei basofili umani.

In una prima serie di esperimenti condotti con la metodica della RT-PCR abbiamo verificato l'espressione dell'mRNA per FPR, FPRL1 e FPRL2 nei basofili umani isolati dal sangue periferico di donatori sani. In una seconda serie di esperimenti, utilizzando agonisti specifici dei recettori formilati, abbiamo valutato l'espressione funzionale degli stessi recettori. Successivamente, abbiamo valutato l'attività chemiotattica, la sintesi e il rilascio di mediatori preformati e citochine proinfiammatorie dalle cellule FcεRI⁺ indotta dai peptidi della gp41.

Oltre all'effetto citopatico diretto che il virus HIV-1 esercita sulle cellule infettate, alcune proteine virali possono essere coinvolte nel determinare la grave immunodeficienza dei pazienti affetti da AIDS. Tat, la proteina transattivatrice del virus HIV-1, ha attratto l'interesse di numerosi gruppi di ricerca. Essa esercita un ruolo

importante sia nell'espressione genica virale che nella replicazione e nel controllo dell'infezione ed è anche in grado di trans-attivare geni eterologhi cellulari e virali (Gaynor, 1995). E' stato dimostrato che mutanti di Tat nella regione ricca di cisteina inibiscono l'espressione dei geni dell'HLA di classe II nei macrofagi e nelle cellule T (Tosi *et al.*, 2000). Inoltre, la proteina Tat è secreta negli spazi extracellulari dalle cellule infettate da HIV-1 (Ensoli *et al.*, 1990; Westendorp *et al.*, 1990; Helland *et al.*, 1991) e può essere captata dalle altre cellule (Frankel and Pabo, 1991) nelle quali è in grado di riattivare un'infezione latente (Helland *et al.*, 1991).

E' ormai evidente che Tat può modificare le funzioni di cellule non infettate con un meccanismo paracrino. Ad esempio, Tat stimola la chemiotassi dei monociti umani (Lafrenie *et al.*, 1996; Albini *et al.*, 1998), delle cellule dendritiche (Benelli *et al.*, 1998) ed è un potente fattore angiogenico in grado di stimolare la migrazione delle cellule endoteliali (Albini *et al.*, 1996). Queste attività potrebbero essere mediate dall'interazione con l'integrina $\alpha_v\beta_5$ (Lafrenie *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1993), con il recettore Flk-1 (Mitola *et al.*, 1998) o con i recettori per le chemochine CCR2 e CCR3 (Albini *et al.*, 1998).

Esistono molteplici evidenze che la proteina Tat possiede multipli domini di legame.

Un dominio, nella regione C-terminale della proteina, contiene la sequenza RGD (Arg-Gly-Asp) che funge da ligando per la famiglia delle integrine (Brake *et al.*, 1990). Nella regione centrale della proteina si trova invece un dominio basico, che sembra interagire con l'eparansolfato (Chang *et al.*, 1997), ed è in grado di attivare il recettore tirosina-chinasi KDR (Albini *et al.*, 1996). Nella regione N-terminale è presente un dominio ricco in cisteina responsabile dell'effetto chemiotattico di Tat. Questi ultimi due domini sono altamente conservati nei differenti ceppi di HIV isolati (Albini *et al.*, 1998). Questi dati indicano che la proteina Tat solubile è in grado di riprodurre alcuni degli effetti di HIV-1 sulle cellule del sistema immunitario e potrebbe quindi svolgere un ruolo rilevante nella patogenesi dell'infezione da HIV-1.

Le cellule che esprimono recettori ad alta affinità per le IgE (FcεRI⁺) (granulociti basofili e mastociti tissutali) svolgono un ruolo patogenetico nelle malattie allergiche dell'apparato respiratorio e cutaneo ed in molteplici condizioni patologiche dell'apparato

cardiaco, gastrointestinale e muscolo-scheletrico (Albini *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1993; Mitola *et al.*, 1997).

L'interazione dell'antigene con la porzione Fab delle IgE presenti su basofili e mastociti ed il conseguente legame a ponte dei recettori FcεRI attiva una serie di eventi biochimici che inducono la secrezione di numerosi mediatori chimici (Brake *et al.*, 1990).

I mediatori chimici sintetizzati dai basofili e dai mastociti umani sono responsabili delle manifestazioni cliniche delle malattie allergiche. Queste cellule contengono granuli citoplasmatici, il cui contenuto può essere liberato, attraverso un meccanismo di esocitosi, in seguito ad attivazione da parte di stimoli immunologici IgE- e non IgE-mediati (Chang *et al.*, 1997). Le cellule FcεRI⁺ sintetizzano l'istamina che è in grado di contrarre la muscolatura liscia bronchiale, aumentare la permeabilità vascolare, modulare il flusso coronarico e la funzione linfocitaria (Albini *et al.*, 1998; Marone, 1985). I basofili ed i mastociti umani, dopo stimolazione IgE-mediata, sintetizzano quantità equivalenti di leucotriene C₄ (LTC₄) e prostaglandina D₂ (PGD₂) (Marone, 1995; Marone, 1995a; Triggiani *et al.*, 1995).

Numerosi gruppi di ricercatori hanno dimostrato che le cellule FcεRI⁺ umane sintetizzano molteplici citochine e chemochine. In particolare, i basofili sintetizzano IL-4, IL-13 e MIP-1α (Marone, 1998; Plaut *et al.*, 1983; Vigorito *et al.*, 1986), mentre i mastociti sintetizzano uno spettro più ampio di citochine (IL-4, IL-5, IL-8, IL-16, TNF-α, etc.) (Marone *et al.*, 1987) e MIP-1α (Stellato *et al.*, 1992). Queste ultime osservazioni indicano che in molteplici malattie immunomediate le cellule FcεRI⁺ umane svolgono anche una significativa funzione immunoregolatrice.

Queste osservazioni inducono ad ipotizzare che le cellule FcεRI⁺ rappresentino una importante fonte di citochine in grado di contribuire alla polarizzazione di tipo T_H2 e quindi alla disregolazione del sistema immunitario in corso di infezione da HIV-1 (Clerici and Shearer, 1994).

I basofili umani esprimono, inoltre, il recettore per chemochine CCR3 che è attivato dalla eotassina e da RANTES (Uguccioni *et al.*, 1997). Recenti studi hanno dimostrato che il recettore CCR3 è anche espresso sui mastociti umani presenti nell'intestino, nella cute, e nei polmoni (Ochi *et al.*, 1999; Romagnani *et al.*, 1999). L'eotassina e

RANTES rappresentano importanti stimoli chemiotattici anche per i mastociti tissutali (Romagnani *et al.*, 1999). Queste cellule esercitano un ruolo importante nella risposta dell'ospite agli agenti infettivi (Malaviya *et al.*, 1996., Prodeus *et al.*, 1997; Patella *et al.*, 2000).

In questo studio abbiamo valutato l'ipotesi che la proteina Tat del virus HIV-1 possa stimolare la chemiotassi e la mobilitazione di Ca^{++} intracellulare dei basofili e dei mastociti umani. Abbiamo osservato che la chemiotassi delle cellule $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^+$ indotta da Tat è inibita dalla preincubazione dei basofili con un anticorpo monoclonale diretto contro CCR3 o da un anticorpo contro un epitopo della proteina Tat. Abbiamo inoltre verificato che Tat induce l'espressione di CCR3 sulle cellule $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^+$. I risultati di queste esperienze dimostrano che Tat induce la chemiotassi di basofili e mastociti umani e che questa attività è mediata dall'interazione con il recettore CCR3.

MATERIALI E METODI

Reagenti

I seguenti reagenti sono stati acquistati dalle ditte indicate in parentesi: PIPES buffer (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); HBSS, FCS e IMDM (GIBCO, Grand Island, NY); RPMI 1640 con 25 mM Hepes buffer, Eagle's minimum essential medium (Flow Laboratories, Irvine, Scotland) (Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, CA); la Ciclosporina A è stata donata da Novartis (Milano). La gp120s ricombinante ed i peptidi sintetici di gp120_{MN} sono stati ottenuti attraverso il “AIDS National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, N.I.H.” (Bethesda, MD); gli anticorpi anti-IgE di coniglio sono stati donati da Teruko e Kimishige Ishizaka (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA); gli anticorpi monoclonali contro la catena γ di Fc γ RI (anti-Fc γ RI) sono stati donati dal Dr. John Hakimi (Roche Research Center, Hoffman-LaRoche, Nutley, NJ).

I seguenti reagenti sono stati ottenuti commercialmente: HClO_4 (Baker Chemical Co., Deventer, The Netherlands); albumina sierica umana (HSA), α -chimotripsina, ialuronidasi, chimopapaina, collagenasi, elastasi tipo I, (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); *Hanks' balanced salt solution* (HBSS), FCS (Gibco, Grand Island, NY), TRIzol, trascrittasi del virus della leucemia murina di Moloney (Life Technologies, Grand Island, NY), desossiribonucleasi I e pronasi (Calbiochem, La Jolla, CA); RPMI 1640 con Hepes Buffer 25 mM, *Eagle's minimum essential medium* (MEM) (Flow Laboratories, Irvine, Scotland); Dextrano 70 e Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden). L'anticorpo monoclonale 7B11 (IgG2a) che lega CCR3 è stato gentilmente donato dalla Leukosite (Boston, MA). Gli anticorpi monoclonali contro la proteina Tat del virus HIV-1 (6.3G12 e 6.15F4) sono stati prodotti da topi BALB/c immunizzati con la proteina Tat¹⁻⁸⁶ sintetica e caratterizzati per la specificità ai loro epitopi⁽⁵²⁾. L'anticorpo 6.3G12 riconosce un epitopo conformazionale di Tat¹⁻⁸⁶, mentre l'anticorpo 6.15F4 riconosce l'epitopo RRQR⁽⁵²⁾ del dominio della regione basica di Tat. La IL-13 è stata donata dalla Novartis (Basel, Svizzera). Anticorpi policlonali di coniglio IgG

ottenuti da animali non immunizzati sono stati ottenuti dalla Sigma Chemical Co. L'anticorpo di coniglio anti-IgE è stato donato dai Dottori Teruko e Kimishige Ishizaka (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA). La proteina Tat usata in questi esperimenti è stata ottenuta attraverso la sintesi in fase solida⁽⁵²⁾. Tat è stata disciolta a 10 µg/ml in tampone PBS contenente 0,1 mM DTT ed è stata congelata in aliquote a -80°C. La soluzione contenente Tat è stata testata ed è stata trovata negativa per la contaminazione da endotossine.

Buffers

Il PIPES buffer usato in questi esperimenti è stato ottenuto con 25 mM PIPES, pH 7.37, 110 mM NaCl, 5 mM KCl. Il P. PCG contiene in aggiunta P, 5 mM CaCl₂ e 1 g/litro di destrano (Patella *et al.*, 1995). Il tampone PAGMC contiene, oltre al P, albumina sierica umana al 3%, CaCl₂ 1 mM, 1 g/l di destrosio e 0,25 g/l di MgCl₂·6H₂O (pH 7,4); il tampone PGMD contiene, oltre al P, 0,25 g/l di MgCl₂·6 H₂O, 10 mg/l di DNase, e 1 g/l di gelatina (pH 7,4). Il PBS

contiene NaCl 8 g/l, Na₂HPO₄ 1,15 g/l, KCl 200 mg/l e KH₂PO₄ 200 mg/l (pH 7,4).

Purificazione dei Basofili Umani dal Sangue Periferico

I basofili sono stati purificati dal sangue periferico di individui sani negativi per anticorpi anti-HIV-1 e HIV-2 fornitoci dal Servizio di Immunoematologia dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. I leucociti sono stati risospesi in PBS contenente 0.5 g/l di albumina sierica umana (HSA) e 3.42 g/l Na citrato e, quindi, purificati usando un elutriatore controcorrente (modello J2-21, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA). Le frazioni contenenti molti basofili ($> 10 \times 10^6$) e con una buona purezza ($> 15\%$) sono state ulteriormente purificate su gradiente discontinuo di Percoll (Patella *et al.*, 1995). .. I basofili sono stati purificati con una omogeneità $>98\%$ eliminando linfociti B, monociti, cellule NK, cellule dendridiche, eritrociti, piastrine, neutrofili, eosinofili e cellule T usando un cocktail di apteni coniugati CD3, CD7, CD14, CD15, CD16, CD36, CD45RA e anticorpi anti-HLA-DR e MACS Micro Beads coniugate con anticorpi anti-apteni. Le cellule magneticamente marcate sono state

eliminate attraverso la loro ritenzione in una colonna MACS su un supporto magnetico della MidiMACS (Miltenyi, Biotec.Bergish Gladbach, Germany). Con tale metodica si ottiene un numero di basofili variabile tra 3×10^6 e 10×10^6 con una purezza in genere $>98\%$ ⁽⁵³⁾, come attestato dalla colorazione dei basofili con Alcian blue e dal conteggio nella camera di conta per eosinofili di Spiers-Levy. I basofili sono stati messi in coltura (37°C , 16 h) in presenza di IL-3 umana ricombinante (10 ng/ml) prima dell'aggiunta degli stimoli.

Purificazione dei Mastociti Polmonari

Il tessuto macroscopicamente normale di pazienti sottoposti a toracotomia e resezione polmonare è stato trattato come descritto (Patella *et al.*, 1993). E' stato ottenuto un numero di mastociti compreso tra 8×10^6 e 20×10^6 , con una purezza compresa tra l'1% e l'8%. Le cellule sono state risospese e incubate *overnight* in RPMI 1640 contenente 25 mM di HEPES, 2 mM di L-glutamina, 1% di gentamicina e 10% di FCS (Patella *et al.*, 1993). I mastociti sono stati ulteriormente purificati attraverso un'elutrazione controcorrente e successivo passaggio su Percoll a gradiente di densità (Patella *et al.*,

1993). I mastociti sono stati purificati per selezione positiva attraverso l' incubazione con un anticorpo anti-FcεRI seguita dall' esposizione a biglie magnetiche coniugate con MACS anticorpi di capra diretti contro IgG di topo. La preparazione finale conteneva più del 95% di cellule vitali saggiate con il metodo d' esclusione del trypan blue e la purezza era >90%.

Analisi citofluorimetrica delle molecole di superficie

L' analisi citofluorimetrica delle molecole presenti sulla superficie cellulare è stata condotta come descritto in precedenza⁽⁴⁸⁾. Dopo la saturazione dei siti di legame non specifici con IgG di coniglio, le cellule sono state incubate (20 minuti a 4°C) con anticorpi specifici o con controlli isotipici. Per la marcatura indiretta questo passaggio è stato seguito da una seconda incubazione con un anticorpo anti-isotipo marcato con un fluorocromo. Infine, le cellule sono state lavate ed analizzate con un citofluorimetro FACScan utilizzando sia il software LYSIS II sia Win MDI (Becton & Dickinson, San Fernando, CA). Un totale di 10^4 eventi per ogni campione è stato acquisito in tutte le analisi citofluorimetriche eseguite.

IgM Monoclonali Umane

Le IgM monoclonali sono state purificate dal siero di pazienti con macroglobulinemia di Waldenstrom attraverso filtrazione su gel (Patella *et al.*, 1993). Le regioni variabili delle IgM monoclonali sono state determinate usando un ben caratterizzato pannello di reagenti dipendente dalla sequenza primaria V_H e specifico per la famiglia V_K che identifica le regioni *framework* (Patella *et al.*, 1998).

Dosaggio del Rilascio di Istamina e Citochine

I basofili ($\approx 6 \times 10^4$ cellule/condizione) o i mastociti ($\approx 3 \times 10^4$ cellule/condizione) sono stati risospesi in Pipes contenente 1 mM CaCl_2 (per il rilascio di istamina) o IMDM (per il rilascio di citochine). E' stata, poi, aggiunta la gp120 isolata da diverse cladi del virus ed abbiamo incubato a 37°C per 45 min (per la valutazione dell'*histamine release*), 4 ore (per la secrezione di IL-4) oppure 18 ore (per la determinazione della secrezione di IL-13) (Patella *et al.*, 1998; 1999). La reazione è stata fermata attraverso centrifugazione ($1000 \times g$, 22°C , 2 min); i sovranatanti sono stati conservati -20°C per il

successivo dosaggio dell'istamina e delle citochine. Il dosaggio dell'istamina è stato effettuato con metodica fluoronefelometrica (Siraganian, 1974). IL dosaggio dell'IL-4 e dell'IL-13 è stato effettuato usando kits ELISA ad alta sensibilità (R&D Systems, Minneapolis, MN) (Patella *et al.*, 1998).

Chemiotassi delle cellule $Fc\epsilon RI^+$

La chemiotassi dei basofili è stata effettuata utilizzando la tecnica della camera di Boyden^(48,54). In sintesi, 25 μ l di tampone (PAGMC) o di concentrazioni variabili degli stimoli da testare, sono stati posti in triplicato nel compartimento inferiore di una camera per micro-chemiotassi costituita da 48 pozzetti (Neuroprobe, Cabin John, MD). Il compartimento inferiore è stato ricoperto da una membrana in policarbonato con pori di 5 μ m oppure con un sandwich a 2 filtri costituito da una membrana di policarbonato con pori di 5 μ m disposta al di sotto di una con pori di 8 μ m (Nucleopore Corp., Pleasanton, CA). Successivamente 50 μ l (5×10^4 cellule/pozzetto) della sospensione in PAGMC sono stati aggiunti in ogni pozzetto del compartimento superiore. La camera per la chemiotassi è stata posta

per 1 ora (basofili) o 3 ore (mastociti) a 37° C in un incubatore con CO₂ al 5% (Automatic CO₂ Incubator, Model 160 IR, ICN Flow). Al termine dell'incubazione dei basofili la membrana di policarbonato è stata rimossa, lavata con PBS nella parte superiore, fissata e colorata con May-Grunwald/Giemsa. Nel caso di chemiotassi dei mastociti, la membrana con pori da 8 µm, disposta superiormente, è stata rimossa, mentre quella con pori da 5 µm, disposta inferiormente, è stata fissata in metanolo, colorata con Alcian Blue ed infine montata su un vetrino con Cytoseal (Stephen Scientific, Springfield, NJ). La chemiotassi dei basofili e dei mastociti è stata valutata mediante la conta al microscopio del numero di cellule che sono rimaste adese della membrana con pori da 5 µm. Per ogni esperimento sono stati contati 10 campi per ciascuno dei pozzetti in triplicato ad un ingrandimento di 40x. L'analisi di controllo è stata eseguita per discriminare la migrazione spontanea (chemochinesi) dalla chemiotassi indotta dagli stimoli chemiotattici. I basofili o i mastociti sono stati posti nei pozzetti del compartimento superiore della camera mentre diverse concentrazioni di Tat (6-60 nM), eotassina (10-100 nM), RANTES (10-100 nM) o tampone PAGMC sono state aggiunte nel

compartimento superiore, inferiore o entrambi. La chemochinesi è stata definita in assenza di stimoli chemiotattici o quando questi erano presenti sia nel compartimento superiore che in quello inferiore della camera di Boyden. Da questi esperimenti è risultato che basofili e mastociti migrano in risposta a Tat, eotassina e RANTES prevalentemente per chemiotassi e non per chemochinesi.

Determinazione del Ca^{++} intracellulare

Le concentrazioni di Ca^{++} intracellulare sono state valutate utilizzando uno spettrofotofluorimetro MSIII (Photon Technology International, South Brunswick, NJ). In sintesi, 2×10^6 basofili sono stati lavati con HEPES (10 mM; pH 7,4). I basofili sono stati quindi incubati con 5 μ M di fura-2/AM nello stesso tampone con aggiunta di 0,8 mM di $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$ e 20 mM di glucosio (22°C per 30 min), lavati due volte e risospesi a $0,5 \times 10^6$ cellule/ml. 2 ml della sospensione cellulare sono stati quindi posti in una cuvetta in quarzo. E' stato verificato che la concentrazione di fura-2 fosse corretta analizzando le medie di eccitazione fra 300 e 400 nm. Le variazioni delle concentrazioni di Ca^{++} intracellulare sono state determinate dai

rapporti di fluorescenza, alla lunghezza d'onda di emissione di 510 nm, dopo eccitazione del campione a 340 e a 380 nm, usando una curva di calibrazione per il fura-2.

Isolamento dell'mRNA, RT-PCR e PCR Quantitativa

L'RNA dei granulociti basofili e dei mastociti umani purificati è stato isolato mediante centrifugazione del *pellet* cellulare per 25', 15.000 rpm, 4°C con 100 :l di Trizol e 900 :l di Cloroformio. Un'aliquota di mRNA cellulare è stata retrotrascritta a cDNA ed amplificata utilizzando un kit commerciale GeneAmp RNA PCR Core Kit (Perkin Elmer International, European Distribution Center, Nieuwerkerk, NL) in accordo con il protocollo del produttore.

Per la PCR quantitativa è stato usato un Kit CytotpressTM Detection Kit (BioSource International Inc., Camarillo, CA, USA). Questa è una tecnica di PCR competitiva in cui un numero noto di copie di un DNA sintetizzato, indicato come “calibrazione interna standard” (ICS), viene amplificato. L'ICS è stato prodotto per contenere i siti di legame per i primer identici al cDNA per IL-4 e un sito unico di legame che permettono al risultante amplificato per ICS

di essere distinto dall'amplificato per IL-4. Il kit CytopressTM contiene i primers per IL-4, uno dei quali è biotinilato per essere incluso nel mix per PCR. Durante l'amplificazione, il primer biotinilato è incorporato sia nell'ICS che nell'amplificato per IL-4. Dopo la PCR, l'amplificato è denaturato e ibridizzato con oligonucleotidi sequenza specifici sia per l'ICS che per l'IL-4. Gli oligonucleotidi di legame vengono pre-legati a delle piastre (microtiter wells). Le sequenze biotinilate e legate vengono rilevate e quantificate attraverso l'aggiunta dell'enzima streptavidina coniugato ad una perossidasi (HRP), seguita dall'aggiunta del substrato. Il segnale generato nella reazione è proporzionale alla quantità di amplificato presente. Successivamente l'ICS viene amplificato con un'efficienza identica a quella per cDNA per IL-4, ed esso può servire come standard per la quantizzazione del cDNA per l'IL-4. Il numero di copie di IL-4 in ogni reazione di PCR è calcolato dal rapporto tra l'OD totale specifico per IL-4 e l'OD totale per ICS moltiplicato il numero di copie immesse di ICS. La formula seguente è stata usata per calcolare le copie iniziali di cDNA per IL-4 nella reazione di PCR:

$$\frac{\text{Totale IL-4 OD}}{\text{Totale ICS OD}} \times 2 \times \text{Numero copie iniziali ICS} = \text{Numero copie iniziali cDNA per IL-4}$$

Il fattore 2 è usato come correzione per il DNA per ICS. Il numero di copie è corretto per ogni diluizione sul cDNA prima dell'amplificazione in accordo con il protocollo del produttore.

Analisi Statistica

I risultati sono espressi come valore medio \pm SEM. La significatività è stata definita come $p < 0,05$.

DISCUSSIONE

La gp120 Induce la Sintesi e la Secrezione di IL-4 e di IL-13 dai Basofili Umani

I basofili umani purificati da individui sani sieronegativi per anticorpi anti- HIV-1 e anti-HIV-2 sono stati messi in coltura con IL-3 umana ricombinante e stimolati con gp120 ricombinante da HIV-1 (30 nM) o con anti-IgE (1 µg/ml). La Figura 1 mostra un esperimento significativo in cui sono stati esaminati gli effetti di gp120 ed anti-IgE sul rilascio di IL-4 e sulla secrezione di istamina. Sia la gp120 che l'anti-IgE inducono un rapido rilascio di IL-4 così come la secrezione di istamina dai basofili. In aggiunta, gp120 ed anti-IgE aumentano l'espressione di mRNA per IL-4 (Fig. 2). Al contrario, l'mRNA per IFN- γ non è stato rilevato in nessuna delle preparazioni di basofili stimolati con gp120, suggerendo che gp120 può indurre nei basofili umani selettivamente citochine di tipo T_H2 (dati non pubblicati).

Per confermare questa ipotesi, sono stati condotti esperimenti per verificare se la gp120 attivava i basofili umani con produzione di IL-13, un'altra citochina T_H2-indotta (Emson *et al.*, 1998; Grünig *et*

al., 1998; Wills-Karp *et al.*, 1998). I risultati di questi esperimenti indicano che, in aggiunta all'istamina e all'IL-4, la gp120 induce anche il rilascio di IL-13. Il rilascio di istamina si completa entro 5 min, il rilascio di IL-4 e di IL-13 entro un massimo di 4 e 18 ore, rispettivamente, dopo l'aggiunta di gp120 (Fig. 3). Questi risultati suggeriscono che, durante le fasi iniziali dell'infezione da HIV, in associazione ad alti livelli di viremia e di diffusione del virus (Pantaleo *et al.*, 1993; Fauci, 1996), i basofili esposti alla gp120 libera o legata al virus (Gelderblom *et al.*, 1987) possono rappresentare una iniziale fonte di IL-4 e di IL-13. Queste citochine possono favorire uno *shift* da un fenotipo di tipo T_H0 ad un fenotipo di tipo T_H2. Inoltre, i basofili umani possono rappresentare una fonte aggiuntiva di IL-4 e di IL-13 nelle fasi avanzate dell'infezione da HIV-1, quando i T linfociti CD4⁺ sono diminuiti.

Effetto di gp120 da Diversi HIV-1 di Diverse Cladi Virali

In un'altra serie di esperimenti abbiamo esaminato l'effetto di quattro gp120 ricombinanti derivate da quattro differenti diverse cladi del virus HIV-1 (gp120_{MN}, gp120_{SF2}, gp120_{LAV}, e gp120_{CM}). Le cladi

e le origini geografiche di queste proteine sono mostrate nella Tabella 1. Tutti questi differenti campioni di gp120 inducono rilascio di IL-4 dai basofili (Fig. 4). Due glicoproteine non correlate, l'albumina sierica bovina e l'albumina sierica umana (1 – 100 nM) non attivavano nessuna delle preparazioni dei basofili (dati non pubblicati). Questi risultati indicano che la capacità di indurre rilascio di citochine dai basofili umani è una caratteristica generale della gp120 di HIV-1 mantenuta attraverso l'evoluzione del virus.

La Ciclosporina A ed il Tacrolimus Inibiscono la Secrezione di IL-4 Indotta da gp120 nei Basofili Umani

Studi condotti dal nostro gruppo dimostrano che i farmaci che legano le immunofilline (ad es., CsA e tacrolimus) inibiscono il rilascio IgE dipendente di mediatori proinfiammatori dalle cellule umane FcεRI⁺ (basofili e mastociti) sia *in vitro* (Cirillo *et al.*, 1990; de Paulis *et al.*, 1991; Patella *et al.*, 1998) che *in vivo* (Casolaro *et al.*, 1993). Per esplorare se l'attivazione dei basofili indotta da gp120 fosse sensibile ai farmaci leganti le immunofilline, abbiamo preincubato le cellule con CsA (24-800 nM) o con tacrolimus (24-800

nM) prima di aggiungere gp120. La CsA inibisce, già a basse concentrazioni come 24 nM, in maniera concentrazione-dipendente il rilascio di istamina e di IL-4 indotta da gp120 nei basofili umani. L'inibizione del rilascio di IL-4 è compresa tra $\approx 30\%$ a 24 nM e 95% a 240 nM. Il tacrolimus è risultato ancora più potente della CsA nell'inibire il rilascio di istamina e di IL-4 indotto da gp-120 nei basofili (dati non pubblicati).

L'influenza di questa classe di farmaci anti-infiammatori/immunosoppressori nella replicazione del virus HIV-1 è stata ben documentata (Karpas *et al.*, 1992; Thali *et al.*, 1994). L'osservazione che le cellule T_H2 siano più suscettibili all'infezione HIV-1 delle cellule T_H1 (Maggi *et al.*, 1994) è stata recentemente spiegata attraverso la sovra-regolazione del recettore CXCR4 indotta dalla IL-4 nei linfociti T_H2 (Galli *et al.*, 1998). I nostri dati forniscono, quindi, un nuovo meccanismo per l'attività antivirale dei farmaci leganti le immunofilline (Karpas *et al.*, 1992; Thali *et al.*, 1994), suggerendo che esso potrebbe essere legato, almeno in parte, alla inibizione della secrezione della IL-4 nei basofili.

Lo Stipping delle IgE Inibisce il Rilascio di IL-4 e di IL-13 Indotto da gp120 nei Basofili Umani

Una breve incubazione dei basofili con acido lattico rimuove la maggior parte delle IgE legate alle cellule $Fc\epsilon RI^+$ ed inibisce l'attivazione IgE mediata di basofili e mastociti (Patella *et al.*, 1993). La rimozione delle IgE con acido lattico blocca completamente la secrezione di IL-4 e di IL-13 indotta da gp120 e da anti-IgE (dati non pubblicati). Al contrario, questo trattamento non ha alcun effetto sulla risposta al *cross-linking* della catena α del recettore ad alta affinità per le IgE ($Fc\epsilon RI$) con anticorpi monoclonali anti- $Fc\epsilon RI$ (Patella *et al.*, 1998). Questi dati supportano fortemente l'ipotesi che la gp120 attivi le cellule $Fc\epsilon RI^+$ attraverso l'interazione con le IgE di superficie.

Specificità di Interazione tra gp120 ed IgE

Un'altra serie di esperimenti è stata effettuata per confermare l'interazione tra gp120 e le IgE legate ai basofili umani e per verificare la specificità della regione V_H riconosciuta dalla gp120. La famiglia V_{H3}^+ è la più rappresentata delle famiglie immunoglobuliniche V_H come prodotto genico nel repertorio umano

ed è espressa in circa il 50% delle immunoglobuline sieriche umane (Berberian *et al.*, 1993; Silverman, 1997; Karray *et al.*, 1998). In questi esperimenti, la gp120 (30 nM) è stata preincubata (15 min, 37° C) con concentrazioni crescenti (da 0.1 a 10 µg/ml) di 3 differenti IgM umane monoclonali V_H3⁺ (IgM M3, IgM M11, e IgM LAN) o con IgM monoclonali V_H6⁺ (M 14). I Basofili sono stati incubati per 4 h a 37° C. Al termine dell'incubazione, la IL-4 è stata misurata dai sovrinatanti. La Figura 5 mostra che la preincubazione di gp120 con IgM monoclonali (M3, M11, e LAN) che hanno un dominio V_H3 inibiscono in maniera concentrazione dipendente la secrezione di IL-4 indotta da gp120. Al contrario, la preincubazione di gp120 con IgM monoclonali (M14), che possiedono dominio V_H6 non ha alcun effetto sul rilascio di IL-4. Questi dati supportano l'ipotesi che la gp120 lega le IgE umane riconoscendo la regione V_H3, ma non la V_H6.

Dati analoghi sono stati ottenuti usando mastociti umani isolati da parenchima polmonare. La gp120 isolata da differenti cladi del virus HIV-1 induce rilascio di istamina dai mastociti polmonari umani. Anche nei mastociti la preincubazione con tre differenti IgM monoclonali V_H3⁺, ma non con IgM V_H6⁺, inibisce il rilascio di

mediatore indotto da gp120 (dati non pubblicati). Nell'insieme, questi dati indicano che la gp120 attiva i mastociti umani allo stesso modo dei basofili umani. Gli effetti della gp120 sono mediati dalla stretta interazione con la regione V_H3 delle IgE legate alla superficie delle cellule FcεRI⁺.

Effetti dei Peptidi Sintetici di gp120_{MN} sul Rilascio di IL-4 Indotto da gp120_{MN}

Per mappare i siti leganti le IgE sulla gp120, abbiamo testato la capacità inibitoria di un pannello di peptidi sintetici compresi nella sequenza della gp120_{MN} (Goodlick *et al.*, 1995). Le caratteristiche biochimiche dei peptidi usati in questi esperimenti sono indicati nella Tabella II. La preincubazione dei basofili con i peptidi sintetici di gp120_{MN}, della porzione centrale (1959, 1960, 1985, 1988 e 1989) inibisce in maniera concentrazione dipendente il rilascio di IL-4 indotto da gp120_{MN}. Al contrario, i peptidi 1922 e 2015, che appartengono rispettivamente alle regioni amino- e carbossi-terminale di gp120_{MN}, non hanno alcun effetto. I peptidi inibitori da soli non inducono e non hanno alcun effetto sul rilascio di istamina e di IL-4

indotto da anti-IgE nei basofili e nei mastociti (dati non pubblicati). Questi risultati sono in armonia con l'ipotesi che il sito(i) di legame per il superantigene sulla gp120 è formato da sequenze proteiche di almeno due regioni che modificano in maniera discontinua i domini costanti e variabili della molecola (Karray *et al.*, 1997).

Effetti di peptidi della gp41 sul rilascio di istamina e citochine dai basofili umani

Abbiamo valutato l'effetto di concentrazioni crescenti (10^{-8} - 10^{-6} M) di peptidi sintetici della gp41 sul rilascio di istamina da basofili umani purificati (> 98%) da sangue periferico di donatori sani negativi per anticorpi anti HIV-1 e HIV-2. In sei esperimenti, nessuno dei peptidi testati determinavano il rilascio di istamina dai basofili. In questi esperimenti abbiamo utilizzato, come controllo, due stimoli IgE mediati (anti-IgE e gp120) che determinano un legame crociato con le IgE sulla superficie dei basofili. Abbiamo inoltre utilizzato FMLP che attiva un recettore STM sui basofili indipendente dal recettore per le IgE. Abbiamo dimostrato che anti-IgE, gp120 e FMLP sono in grado di indurre rilascio di istamina dai basofili umani purificati.

Cross-desensibilizzazione tra i peptidi della gp41 di HIV-1 e l'FMLP

La relazione tra i peptidi della gp41 e FMLP è stata ulteriormente esaminata valutando gli effetti della cross-desensibilizzazione tra questi stimoli sulla chemiotassi dei basofili. I basofili purificati sono stati trattati con buffer, con basse concentrazioni di FMLP (5×10^{-7} M) o con gp41 2019 (5×10^{-7} M) in assenza di calcio per 30 min a 37°C. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate e risospese in un buffer contenente calcio (PACGM). Abbiamo riscontrato che l'effetto chemiotattico indotto dall'FMLP o da gp41 2019 è significativamente diminuito dalla preincubazione con stimoli omologhi. Quando le cellule erano preincubate con basse concentrazioni di FMLP (5×10^{-7} M) la risposta a stimoli eterologhi (gp41 2019) non è significativamente modificata. Al contrario, differenti risultati sono stati ottenuti quando le cellule erano preincubate con alte concentrazioni di FMLP (10^{-4} M), che legando ad alte dosi anche FPRL-1 produce un effetto di desensibilizzazione.

Effetti dei peptidi della gp41 di HIV-1 sul rilascio di istamina dai basofili umani indotto dall'anti-IgE.

In questa serie di esperimenti abbiamo preincubato le cellule (5-60 min a 37°C) con differenti concentrazioni (10^{-8} – 10^{-6} M) di gp41 2019 e 2021 e successivamente le abbiamo incubate (30 min a 37°C) con concentrazioni ottimali (0.1 µg/ml) di anti-IgE. Abbiamo valutato che le diverse concentrazioni dei peptidi della gp41 non inibiscono il rilascio di istamina dai basofili indotto dall'anti-IgE.

L'interazione di peptidi della gp41 con FMLP induce il rilascio di istamina dai basofili.

In un'altra serie di esperimenti abbiamo dimostrato che la la preincubazione (60 min a 37°C) dei basofili con il peptide 2019 (10^{-8} - 3×10^{-7} M) inibisce, in modo dose dipendente, il rilascio di istamina, indotto da FMLP, dai basofili umani. L'incubazione dei basofili con concentrazioni crescenti di 2019 inibisce l'effetto massimale dell'FMLP. Simili effetti sono stati ottenuti in tre esperimenti nei quali i basofili erano incubati con il peptide 2021 (10^{-8} - 10^{-6} M) prima della stimolazione con dosi crescenti di FMLP.

Effetti del peptide 2021 di gp41 di HIV-1 sulla sintesi di mRNA per IL-13 mediato da FMLP nei basofili umani

E' stato descritto che FMLP stimola la produzione *de novo* dell'IL-13 nei basofili umani (Ochensberger *et al.*, 1999). In una prima serie di esperimenti abbiamo preincubato i basofili (60 min a 37°C) con il peptide 2021. Le cellule sono state stimulate successivamente per 6 ore a 37°C con FMLP (10^{-6} M). Mediante tecnica di RT-PCR è stata valutata l'espressione di mRNA per IL-13. Abbiamo dimostrato che la preincubazione dei basofili con gp41 2021 è in grado di inibire la sintesi dell'mRNA per IL-13 indotto da FMLP.

Effetti del peptide 2019 e 2021 della gp41 di HIV-1 sul rilascio di IL-13 indotto da FMLP dai basofili umani.

In una serie di tre esperimenti abbiamo preincubato (60 min a 37°C) i basofili con differenti concentrazioni di peptide 2019 e 2021 (10^{-8} - 10^{-6} M) successivamente stimolati con FMLP. Abbiamo osservato che la preincubazione con tali peptidi determina, in modo dose-dipendente (10% con 10^{-8} M fino al 90% con 10^{-6} M), un'inibizione del rilascio di IL-13. I risultati dimostrano che sia 2019

che 2021 inibiscono sia la sintesi che il rilascio di IL-13 dai basofili indotto da FMLP.

Effetti di peptidi della gp41 di HIV-1 sulla chemiotassi dei basofili umani.

In una prima serie di esperimenti, abbiamo valutato gli effetti di peptidi sintetici (2017, 2019, 2020, 2021, 2023, 2025, 2027, 2029, 2030, 2031, 2035) che costituiscono la sequenza della gp41 di HIV-1 (5×10^{-7} M) sulla chemiotassi dei basofili purificati (> 98%) dal sangue periferico di donatori sani negativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2. I risultati dimostrano che dei peptidi della gp41_{MN} utilizzati soltanto i peptidi 2019 e 2021 inducono la chemiotassi dei basofili. Il massimo effetto chemiotattico osservato è di poco inferiore a quello indotto da concentrazioni ottimali di FMLP (5×10^{-7} M), che rappresenta lo stimolo più efficace e meglio caratterizzato per i basofili.

Effetti della CsH sulla chemiotassi indotta dai peptidi della gp41 e dall'FMLP

E' stato dimostrato che la Ciclosporina H (CsH) è uno specifico inibitore del rilascio di mediatori preformati e sintetizzati *de novo* dai

basofili indotto da FMLP (de Paulis *et al.*, 1991). Recentemente è stato dimostrato che la Ciclosporina H (CsH) è un antagonista specifico per il recettore FPR. In tre esperimenti abbiamo valutato gli effetti della CsH (800 nM) sulla chemiotassi dei basofili indotta dall'FMLP (5×10^{-7} M) e da gp41 2019 (5×10^{-7} M). La preincubazione (15 min a 37°C) dei basofili con la CsH inibisce in maniera significativa la chemiotassi indotta da FMLP. In nessuno degli esperimenti la CsH inibisce la chemiotassi indotta da gp41 2019. Risultati simili sono stati ottenuti quando la chemiotassi dei basofili era indotta da gp41 2021. Questi risultati sono compatibili con l'ipotesi che l'FMLP induca la chemiotassi dei basofili attraverso il recettore FPR, mentre i peptidi della gp41 sono attivi su differenti sottotipi di recettori per l'FMLP (FPRL-1 e FPRL-2).

Effetti di Tat sulla chemiotassi dei basofili umani

E' stato dimostrato che la proteina Tat induce la chemiotassi dei monociti umani attraverso l'interazione di una regione della proteina con i recettori CCR2 e CCR3 per le β -chemochine⁽²⁰⁾. In un primo gruppo di esperimenti abbiamo valutato gli effetti di concentrazioni

crescenti di Tat sulla chemiotassi di basofili purificati (>98%) dal sangue di donatori sani negativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2. La Figura 1 mostra i risultati di quattro esperimenti che dimostrano che Tat (6-60 nM) è in grado di indurre, in maniera dose-dipendente, la chemiotassi dei basofili. In una serie parallela di esperimenti, abbiamo comparato l'attività chemiotattica di Tat con quella di eotassina e di RANTES, che rappresentano potenti stimoli chemiotattici per i basofili umani⁽⁴⁶⁾. La Figura 2 mostra che l'eotassina ed RANTES inducono la chemiotassi dei basofili umani. Negli stessi esperimenti Tat promuove la migrazione dei basofili purificati da donatori sani.

Effetti di Tat sulla mobilitazione del Ca^{++} intracellulare nei basofili

Le variazioni nella concentrazione di Ca^{++} intracellulare sono prerequisiti fondamentali per la trasduzione del segnale chemiotattico esercitato dalle chemochine⁽⁵⁸⁾. Abbiamo quindi valutato l'effetto di Tat sull'influsso di Ca^{++} nei basofili. La Figura 3 mostra che l'aggiunta di Tat (60 nM) alla sospensione cellulare contenente basofili umani preventivamente marcati con l'indicatore fluorescente

del Ca^{++} fura-2, produce un rapido e transitorio aumento delle concentrazioni di Ca^{++} intracellulare. Il pattern di mobilizzazione del Ca^{++} causato da Tat è tipico delle chemochine⁽⁵⁹⁾, come mostrato dal controllo positivo effettuato con eotassina (100 nM). Questo effetto è specifico di Tat, in quanto la preincubazione con un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina, è in grado di bloccare l'induzione della mobilizzazione del Ca^{++} intracellulare determinata da Tat nei basofili (dati non mostrati).

La chemiotassi dei basofili indotta da Tat è mediata dall'interazione della proteina con CCR3

Circa l'80% dei basofili isolati dal sangue periferico di donatori sani esprimono CCR3^(38, 40). Abbiamo realizzato una serie di esperimenti in cui i basofili umani purificati erano preincubati con un anticorpo diretto contro CCR3 ed abbiamo quindi successivamente valutato la capacità delle cellule di migrare in risposta a Tat. La Figura 4 mostra i risultati di tre esperimenti che dimostrano che la preincubazione dei basofili con un anticorpo anti-CCR3 inibisce completamente l'effetto chemiotattico indotto dalla proteina Tat. In

una serie parallela di esperimenti, abbiamo verificato che la preincubazione dei basofili con l'anticorpo anti-CCR3 sopprime anche l'attività chemiotattica esercitata sui basofili sia dall'eotassina che da RANTES (Figura 5). Al contrario, l'effetto chemiotattico di un tripeptide formilato (FMLP), che interagisce con un recettore diverso da CCR3⁽⁶⁰⁾, non è neutralizzato dall'anticorpo diretto contro il recettore CCR3.

CONCLUSIONI

I nostri studi dimostrano, dunque, che la gp120 isolata da diverse cladi di HIV-1 induce la sintesi ed il rilascio di IL-4 e di IL-13 dalle cellule umane FcεRI⁺. L'attività della gp120 è mediata dalla interazione con la regione V_H3 delle IgE presenti su basofili e mastociti umani. Questa è la prima dimostrazione che la gp120 determina il rilascio di due citochine che hanno un ruolo determinante nella polarizzazione T_H2 da cellule diverse dai T linfociti. La IL-4 e la IL-13 rilasciata dalle cellule umane FcεRI⁺ potrebbe avere

indirettamente un ruolo nell'entrata del virus HIV-1 nelle cellule CD4⁺. Infatti, la IL-4 induce una sovraregolazione del recettore per le chemochine CXCR4 (Galli *et al.*, 1998) che, insieme con CCR5, è il maggiore corecettore facilitante l'ingresso di HIV-1 nelle cellule CD4⁺ (Dragic *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996; Ostrowski *et al.*, 1998). Il legame del CXCR4 è inoltre sufficiente per dare inizio alla deplezione dei T linfociti CD4⁺ (Penn *et al.*, 1999). Inoltre, la IL-4 e la IL-13 attivano i monociti a produrre il *macrophage-derived chemokine* (MDC), una chemochina attiva selettivamente sul recettore CCR4 espresso sulle cellule T_H2 (Bonecchi *et al.*, 1998). Dunque, la IL-4 e la IL-13 sono importanti non solo per lo *switch* T_H2 nella risposta cellulare T ma anche nell'infezione e replicazione del virus HIV-1 nelle cellule T_H2 (Maggi *et al.*, 1994; Rancinan *et al.*, 1998). In questo contesto, la produzione di IL-4 e di IL-13 da altre cellule oltre che dai T linfociti potrebbe avere un ruolo cruciale in ambedue le fasi iniziale e tardiva della infezione da HIV. Due di queste cellule potrebbero essere i basofili ed i mastociti (cellule FcεRI⁺) che producono selettivamente IL-4 e IL-13 quando attivate dalla gp120. L'importanza di questa osservazione è ulteriormente rafforzata se si

considera che i basofili rappresentano lo 0.5-1 % dei leucociti del sangue periferico (Marone, 1995a; 1995b) mentre le cellule T_H2 costituiscono soltanto lo 0.2-2% delle cellule CD4⁺ (Andrew *et al.*, 1998).

In conclusione, abbiamo fornito la prima evidenza che la gp120 di differenti cladi virali induce il rilascio di IL-4 e di IL-13 dalle cellule umane FcεRI⁺. Poichè l'entrata nell'organismo del virus HIV-1 avviene in modo predominante attraverso le superfici mucose e poichè le fasi iniziali dell'infezione sono associate con alti livelli di viremia (Fauci, 1996), i mastociti ed i basofili possono essere esposti alla gp120 libera o legata al virus. Ciò suggerisce che le cellule FcεRI⁺ possano rappresentare una nuova fonte di citochine T_H2 contribuendo così alla disregolazione del sistema immunitario nella infezione da HIV-1. La seconda affermazione potrebbe riconciliare l'apparente contrasto tra i risultati ottenuti da molti ricercatori (Clerici *et al.*, 1993; Barcellini *et al.*, 1994; Graziosi *et al.*, 1994; Maggi *et al.*, 1994; Meyaard *et al.*, 1994; Fakoya *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1997). Infatti, ciò evidenzia l'importanza del superantigene virale specifico, gp120, che agisce su cellule diverse dai linfociti nella produzione di citochine

di tipo T_H2 . Questa nuova osservazione potrebbe essere rilevante per la produzione di nuovi farmaci attivi selettivamente sulle cellule $Fc\epsilon RI^+$ nel trattamento dei soggetti infetti da HIV-1.

I nostri risultati consentono, dunque, di prospettare un nuovo meccanismo di propagazione dell'infezione da HIV-1 dalle cellule $Fc\epsilon RI^+$; in realtà, l'importanza di CCR3 come corecettore per differenti ceppi HIV-1, l'up-regolazione di CCR3 indotta da Tat e l'interazione tra gp120 e cellule $Fc\epsilon RI^+$, inducono a ritenere che le cellule $Fc\epsilon RI^+$ possano essere infettate da HIV-1.

In questo studio abbiamo anche dimostrato che due peptidi 2019 e 2021 della gp41 di HIV-1 sono potenti chemoattrattanti per i basofili e i mastociti e sono in grado di inibire selettivamente il rilascio di mediatori preformati e di citochine dai basofili umani. Questa è la prima dimostrazione che 2019 e 2021 sono funzionalmente attivi sulle cellule umane $Fc\epsilon RI^+$ verosimilmente tramite l'interazione con il recettore/i per FMLP. I basofili umani, ma non i mastociti, esprimono i recettori per FMLP che induce la chemiotassi dei basofili e il rilascio di mediatori proinfiammatori. Tre diversi FPRs sono stati identificati su differenti tipi cellulari. Questi sottotipi recettoriali appartengono

all'STM una proteina G della superfamiglia della Rodopsina. La FPR ha un'elevata affinità per FMLP ed è attivata da concentrazioni picomolari di quest'ultimo. FPRL-1 è un recettore promiscuo attivato da FMLP, lipossina A4, paptide HP(2-20) di *Helicobacter pylori* e Amiloide sierica A e da differenti peptidi sintetici. I monociti umani esprimono FPRL-2 e HP(2-20) è chemotattico per queste cellule mediante l'interazione con questo recettore. Ulteriori studi dovranno essere effettuati per definire la distribuzione dei sottotipi recettoriali di FPR sui basofili umani ed il loro significato biologico nelle risposte immunitarie in corso di infezione da HIV-1. I risultati del nostro studio rivelano che le interazioni fra gp41 e i recettori per FMLP espressi sui basofili umani sono molto piu' complesse di quanto si credeva fin ora. E' noto che la CsH blocca le risposte FPR mediate essa è infatti in grado di bloccare l'attività chemiotattica dell'FMLP sui basofili ma non ha alcun effetto sulle risposte evocate dai peptidi 2019 e 2021 della gp41. Per studiare la specificità di attivazione tra i peptidi di gp41 e l'FMLP abbiamo effettuato esperimenti di cross-desensibilizzazione. Dopo il legame dell'FMLP al suo recettore FPR si ha la fosforilazione di quest'ultimo, le cellule sono quindi

desensibilizzate ed incapaci di generare segnali tramite i medesimi recettori. Abbiamo dimostrato che i basofili preincubati con FMLP, in assenza di Ca^{2+} , erano incapaci di generare una risposta chemiotattica, quando le cellule erano preincubate con un buffer contenente Ca^{2+} esse erano in grado di promuovere la chemiotassi (desensibilizzazione omologa). Analogamente i basofili preincubati con 2019 e 2021 erano desensibilizzati ad una successiva stimolazione. Diverse desensibilizzazioni determinano risultati interessanti e apparentemente contrastanti. Quando i basofili sono stati preincubati con basse concentrazioni di (5×10^{-7} M) FMLP, che lega ad alta affinità solo FPR ma non FPRL-1, la risposta chemiotattica ad uno stimolo eterologo (gp41 2019) non è stata ottenuta. Al contrario, la preincubazione dei basofili con alte concentrazioni (10^{-4} M) di FMLP, che lega anche FPRL-1, ha determinato una risposta chemiotattica a gp41 2019 significativamente ridotta. Il risultato di questi due gruppi di esperimenti concordano con l'ipotesi che gp41 e FMLP agiscano tramite differenti sottotipi di FPR nell'induzione della chemiotassi dei basofili umani. Infatti FMLP agisce essenzialmente tramite l'interazione con FPR mentre gp41 agisce presumibilmente

interagendo con FPRL-1. Diversi studi hanno esaminato la complessa interazione di gp41 e i recettori per FMLP espressi sui fagociti umani. E' stato scoperto che il derivato retrovirale esapeptidico LDLLFL è un potente inibitore della risposta dei monociti e granulociti umani indotta da FMLP. Lawless *et al.* hanno dimostrato che 2 peptidi sintetici, T21 e T20, corrispondenti alle sequenze aminoacidiche 558-595 e 643-678, rispettivamente in HIV-1_{LAI} gp41 sono potenti inibitori della fusione virale dell'HIV-1. Ueda *et al.* hanno dimostrato che gp41 è un potente inibitore della chemiotassi indotta da FMLP nei monociti umani. Lo stesso gruppo ha evidenziato che T21 attiva i fagociti umani tramite FPR e FPRL-1. E' stato inoltre dimostrato che analoghi sintetici del T20, che legano sequenze N terminali, agiscono come antagonisti FPR. Inoltre un peptide sintetico, corrispondente ai residui aminoacidici 414-434 down-regola l'espressione dei recettori CCR5 e CXCR4 tramite l'attivazione di FPRL-1. Infine un'esapeptide sintetico (trp-lys-tyr-val-D-Met) che utilizza sia FPR che FPRL-1 agisce come potente agonista sulla stimolazione dei fagociti umani. Questi risultati enfatizzano i diversi effetti dei derivati peptidici retrovirali sulle cellule del sistema immunitario. Nei nostri

esperimenti abbiamo inoltre dimostrato che un'incubazione prolungata con basse concentrazioni di 2019 e 2021 sulla catena dell'MN inibisce il rilascio di mediatori preformati e la sintesi di citochine da parte dei basofili umani attivati da FMLP. Inoltre numerosi peptidi sintetici comprendenti la struttura dell'envelope di gp41 dell'HIV_{MN} non determina il rilascio di citochine e mediatori proinfiammatori dai basofili umani; i peptidi 2019 e 2021 specificamente antagonizzano l'attivazione dei basofili indotta da FMLP. Questi risultati sono interessanti per molteplici motivi. In primo luogo essi dimostrano che i peptidi 2019 e 2021 esercitano differenti effetti sulla chemiotassi dei basofili e sulla secrezione di mediatori da queste cellule. Infatti nel precedente sistema i peptidi, presumibilmente, inducono la chemiotassi dei basofili tramite l'interazione con FPRL-1. In un secondo sistema, basse concentrazioni dei peptidi 2019 e 2021 richiedono un lungo periodo di preincubazione (35-60 min) per attivare i basofili mediante FMLP. Questo ritardo potrebbe essere necessario per attivare/disattivare alcuni steps metabolici o per determinare l'internalizzazione del recettore FMLP. Questi dati suggeriscono che l'attività chemiotattica e il rilascio di mediatori dai

basofili, indotto da FMLP e dai peptidi di gp41, sia mediato dall'attivazione di differenti sottotipi di FPR. Alternativamente esiste la possibilità che i meccanismi di trasduzione del segnale, necessari per la chemiotassi e la secrezione di mediatori, siano differentemente inibiti e/o modulati dai peptidi gp41 e FMLP. L'ultima ipotesi potrebbe essere che i peptidi di gp41, l'FMLP in aggiunta a FPR, FPRL-1 ed FPRL-2 siano in grado di attivare o antagonizzare recettori/e sconosciuti sui basofili. Qualunque sia il meccanismo utilizzato i nostri risultati dimostrano la complessità dell'interazione tra FMLP, peptidi della gp41 e i sottotipi FPR sui basofili umani. Durante l'infezione da HIV-1 l'envelope gp160 è clivato enzimaticamente producendo due proteine mature la gp41 transmembrana e la gp120 di superficie. L'infezione da HIV-1 è conseguenziale al legame, ad alta affinità, di gp120 con CD4 che è il recettore principale per HIV-1. gp41 sembrerebbe mediare la fusione tra la membrana virale e cellulare tramite l'inserzione di residui N-terminali idrofobici sulla membrana plasmatica. Diverse linee di ricerca dimostrano che gp41 esercita molteplici effetti su sistema immunitario. gp41 solubile induce, infatti, il rilascio di citochine

proinfiammatorie (TNF α e IL-1), sopprime la proliferazione linfocitaria, induce la secrezione di IL-10 nei monociti. La proteina gp41 è stata riscontrata nel tessuto cerebrale di pazienti affetti da demenza in corso di AIDS e anticorpi che riconoscono vari epitopi di gp41 sono stati riscontrati nelle prime fasi dell'infezione da HIV-1. Inoltre è stato documentato che monociti e neutrofili, isolati da pazienti affetti da HIV-1, rispondono debolmente ad una varietà di chemoattrattanti, incluso FMLP. Le interazioni del peptide gp41 con FPRs sui basofili umani potrebbe essere di notevole rilevanza clinica in pazienti con infezione da HIV-1. Dunque, un'altra glicoproteina dell'envelope, gp41, può interferire con la produzione di citochine nei basofili umani.

I risultati di questo studio dimostrano che la proteina Tat del virus HIV-1 è chemotattica per le cellule Fc ϵ RI⁺ umane. Tale attività è mediata dall'interazione con il recettore CCR3 presente sui basofili e su una significativa percentuale di mastociti. Inoltre, la proteina Tat è in grado di aumentare sia la trascrizione di mRNA per CCR3 che l'espressione del recettore sui basofili umani. Questi risultati dimostrano per la prima volta, che la proteina Tat è un analogo delle

β -chemochine codificata da HIV-1 (virochina), funzionalmente attiva sulle cellule $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^+$ attraverso l'interazione con il recettore CCR3.

Questi risultati hanno una rilevanza clinica per almeno quattro diversi aspetti. Innanzi tutto suggeriscono che nelle fasi precoci dell'infezione da HIV-1, che si associano ad alte concentrazioni di Tat nel siero e nei liquidi biologici⁽¹⁶⁾, questa proteina possa influenzare la migrazione di basofili e mastociti esposti alla proteina Tat presente negli spazi extracellulari, contribuendo così ad aumentare la loro densità nei siti dell'infezione da HIV-1. In secondo luogo, l'attività chemiotattica di Tat nei confronti delle cellule $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^+$ può contribuire all'aumento della densità di mastociti e di basofili disponibili alla interazione con HIV-1 attraverso il legame con il virus o con la gp120 solubile. Infatti, il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato che la gp120, ottenuta da diversi cladi virali, interagisce con la regione $\text{V}_{\text{H}3}$ delle IgE presenti sulla superficie delle cellule $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^+$ (Patella *et al.*, 2000). Questa interazione di tipo superantigenico tra gp120 e IgE stimola la sintesi ed il rilascio di IL-4 e di IL-13 dalle cellule $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^+$. Questa interazione potrebbe costituire una fonte iniziale di citochine che favoriscono la polarizzazione delle cellule $\text{T}_{\text{H}0}$ verso il fenotipo

T_H2. Quest'ultima osservazione è particolarmente rilevante, in quanto il virus HIV-1 si replica preferenzialmente nelle cellule T_H2 (Thomas *et al.*, 1990). Infine, i nostri risultati consentono di prospettare un nuovo meccanismo di propagazione dell'infezione da HIV-1. In realtà, l'up-regolazione di CCR3 indotta da Tat nelle cellule umane FcεRI⁺ da noi descritta potrebbe facilitare l'interazione tra il virus e le cellule FcεRI⁺ che avviene attraverso il legame tra le IgE V_H3⁺ e la gp120. Questa interazione consente quindi di ipotizzare un meccanismo aggiuntivo e/o alternativo di propagazione dell'infezione attraverso il quale HIV-1 può interagire ed infettare le cellule FcεRI⁺.

Le nostre osservazioni sono compatibili con l'ipotesi che la proteina Tat interagisca con il recettore CCR3 presente sui basofili e sui mastociti umani (Ochi *et al.*, 1999 Romagnani *et al.*, 1999). Tale ipotesi è supportata anche dall'osservazione che l'anticorpo anti-CCR3 blocca completamente l'effetto chemiotattico della proteina Tat sui basofili e sui mastociti umani. Inoltre, Tat determina un aumento della concentrazione di Ca⁺⁺ rapido e transitorio nei basofili analogo a quello indotto dalle β-chemochine (Sozzoni *et al.*, 1994). Infine, la cross-desensibilizzazione della chemiotassi e dell'influsso di Ca⁺⁺ tra

l'eotassina e Tat è compatibile con l'ipotesi che Tat interagisca con il recettore CCR3 presente sulle cellule FcεRI⁺ umane.

E' stato già dimostrato che Tat induce l'espressione di CXCR4 sui linfociti e monociti, mentre l'espressione di CCR3 e CCR5 è indotta solo sui monoliti (Huang *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1999). I risultati presentati in questo lavoro documentano che Tat è in grado sia di up-regolare l'mRNA per CCR3 sia di indurre l'aumento dell'espressione sui basofili umani.

La proteina Tat possiede almeno tre domini ben caratterizzati: una regione basica (aa 46-60), una regione RGD (aa 65-80) ed una regione ricca in cisteina. L'interazione delle regioni basica e del dominio RGD con diversi tipi cellulari non induce significative variazioni delle concentrazioni intracellulari di Ca⁺⁺⁽²⁰⁾. La regione RGD interagisce con le integrine α_vβ₅ (Thomas *et al.*, 1990), mentre la regione basica attiva i recettori che attivano la tirosina-chinasi. Il gruppo di Albini ha dimostrato che Tat stimola la chemiotassi dei monociti attraverso l'interazione dei recettori CCR2 e CCR3 con un peptide (aa 24-51) di Tat che comprende la regione della proteina omologa alle β-chemochine (Albini *et al.*, 1998). Nei nostri

esperimenti la preincubazione con un anticorpo monoclonale specifico per l'epitopo RRQR della regione basica (aa 52-55) (Tosi et al., 2000) non modifica l'attività chemiotattica di Tat. Questi ultimi risultati indicano che questa regione della proteina non è essenziale per tale effetto sulle cellule FcεRI⁺.

E' interessante notare che molti virus si avvalgono della strategia di utilizzare analoghi di chemochine e citochine per sottrarre le cellule infette alle difese immunitarie e favorire la sopravvivenza del virus nell'ospite Kotenko *et al.*, 2000; Lalani *et al.*, 2000). La presenza di questi analoghi di proteine cellulari codificati da virus, rappresenta l'evidenza indiretta del ruolo svolto da tali proteine nell'ambito della risposta dell'ospite agli agenti patogeni (Lalani *et al.*, 2000). Molti virus a DNA, ad es. gli herpes virus, compreso il citomegalovirus e HHV-8, ed i poxvirus, codificano diversi analoghi di β-chemochine (virochine) che attivano CCR3 o CCR8 (MacDonald *et al.*, 1997; Krathwohl *et al.*, 1997; Sozzani *et al.*, 1998; Endres *et al.*, 1999; Dairaghi *et al.*, 1999; Saederup *et al.*, 1999). La proteina Tat di HIV-1 è la prima virochina codificata da un retrovirus, che è funzionalmente attiva sulle cellule FcεRI⁺ attraverso l'interazione con

CCR3. Questa originale osservazione potrebbe avere diversi ed importanti risvolti per una migliore comprensione della patogenesi dell'infezione da HIV-1.

Le concentrazioni di Tat nel siero di soggetti infetti è di 10 ng/ml. Livelli analoghi di Tat sono stati riscontrati nel mezzo di coltura di cellule H9 infettate da HIV-1 (Westendorp *et al.*, 1995). Nei tessuti nei quali avviene la replicazione del virus (i linfonodi), la concentrazione di Tat potrebbe essere di gran lunga maggiore rispetto a quella del siero. Poiché le fasi precoci dell'infezione sono associate ad alti livelli di viremia (Fauci, 1996), e quindi, di conseguenza ad alte concentrazioni sieriche di Tat, l'attività simil-chemiotattica di questa proteina sulle cellule FcεRI⁺ potrebbe avere un ruolo rilevante nei pazienti affetti da AIDS.

Sebbene i recettori per chemochine CXCR4 e CCR5 sono i principali co-recettori per la penetrazione del virus nelle cellule (Moore, 1997; Feng *et al.*, 1996), vi sono evidenze che diversi ceppi di HIV-1 possano utilizzare CCR3 come co-recettore (Choe *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996; He *et al.*, 1997; Ghorpade *et al.*, 1997). I basofili ed i mastociti umani esprimono costitutivamente CCR3

(Uguccioni *et al.*, 1997; Ochi *et al.*, 1999; Romagnani *et al.*, 1999).

Appare pertanto di notevole interesse comprendere l'importanza della capacità di Tat di aumentare l'espressione di CCR3 su queste cellule nella patogenesi dell'infezione da HIV-1. Sembra infatti ipotizzabile che Tat possa contribuire ad aumentare la suscettibilità all'infezione da parte di HIV-1 delle cellule FcεRI⁺.

Abbiamo recentemente dimostrato che l'interazione tra la gp120 e IgE V_H3⁺ presenti sulla membrana di basofili e mastociti induce il rilascio di citochine di tipo T_H2 (IL-4 e IL-13) e non di tipo T_H1 (IFN-γ) (Πατελλας *et al.*, 2000). La presenza del recettore CCR3 sui basofili (Ochi *et al.*, 1999; Romagnani *et al.*, 1999) e su una percentuale significativa di mastociti (Uguccioni *et al.*, 1997; Romagnani *et al.*, 1999) e il suo ruolo come co-recettore per l'infezione da HIV-1 (Choe *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996; He *et al.*, 1997; Ghorpade *et al.*, 1997) suggerisce che l'interazione tra Tat e le cellule FcεRI⁺ possa favorire l'infezione di queste cellule da parte di HIV-1. Appare pertanto verosimile che queste cellule rappresentino un reservoir finora sconosciuto per la replicazione del virus.

La proteina Tat è attualmente allo studio al fine di allestire un vaccino per prevenire l'infezione da HIV-1 (Pauza *et al.*, 2000; Cafaro *et al.*, 1999). Gli effetti della proteina Tat sui basofili e i mastociti umani e la loro complessa interazione con altri stimoli immunologici o citochine (IL-4 e IL-13) rilevanti per la polarizzazione in senso T_H2 (Clerici and Shearer 1994; Maggi *et al.*, 1994) forniscono importanti spunti che occorre tenere in considerazione nel disegno di sperimentazioni cliniche al fine di valutare gli eventuali effetti di vaccini contenenti Tat.

In conclusione, abbiamo dimostrato che Tat è un analogo delle β -chemochine codificato da HIV-1. Tat interagisce con le cellule Fc ϵ RI⁺ attraverso il recettore CCR3 e ne aumenta l'espressione. HIV-1 penetra nell'organismo attraverso le superfici mucose e le fasi precoci dell'infezione sono caratterizzate da alti livelli sierici di viremia. Appare pertanto verosimile che i mastociti ed i basofili possano essere esposti localmente ad alte concentrazioni di Tat. Queste osservazioni consentono di ipotizzare che le cellule Fc ϵ RI⁺, attraverso questo nuovo meccanismo, possano contribuire alla disregolazione del sistema immunitario nel corso d'infezione da HIV-1.

Bibliografia

- ABBAS A.K., MURPHY K.M., SHER A., 1996. *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 383: 787-793.
- ADAMSON D.C., WILDEMANN B., SASAKI M., GLASS J.D., MCARTHUR J.C., CHRISTOV V.I., DAWSON T.M., DAWSON V.L., 1996. *Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41*. Science 274: 1917-1921.
- ALBINI A., SOLDI R., GIUNCIUGLIO D., GIRAUDO E., BENELLI R., PRIMO L., NOONAN D., SALIO M., CAMUSSI G., ROCKL W., BUSSOLINO F., 1996. *The angiogenesis induced by HIV-1 Tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells*. Nat. Med., 2: 1371-1375.
- ALBINI, A., FERRINI S., BENELLI R., SFORZINI S., GIUNCIUGLIO D., ALUIGI M.G., PROUDFOOT A.E.I., ALOUANI S., WEELS T.N.C., MARIANI G., RABIN R.L., FARBER J.M., NOONAN D.M., 1998. *HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines*. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 13153-13158.

- ANDREW D.P., CHANG M., MCNINCH J., WATHEN S. T., RIHANNEK M.,
 TSENG J., SPELLBERG J.P., ELIAS III C.G., 1998. *STCP-1 (MDC)
 CC chemokine acts specifically activated Th2 lymphocytes and
 is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4
 and IL-13*. J. Immunol., 161: 5027-5038.
- BARCELLINI W., RIZZARDI G.P., BORCHI M. O., FAIN C., LAZZARIN
 A., MERONI P.L., 1994. *TH1 and TH2 cytokine production by
 peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected patients*.
 AIDS, 8: 757-762.
- BARRE-SINOSSI F., CHERMANN J.C., REY F., NUGEYRE M.T.,
 CHAMARET S., GRUEST J., DAUGUET C., AXLER-BLIN C.,
 VEZINET-BRUN F., ROUZIOUX C., ROZENBAUM W.,
 MONTAGNIER L., 1983. *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus
 from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome
 (AIDS)*. Rev. Invest. Clin., 56: 126-129.
- BENELLI R., MORTARINI R., ANICHINI A., GIUNGIUGLIO D., NOONAN
 D.M., MONTALTI S., TACCHETTI C., ALBINI A., 1998.
*Monocyte-derived dendritic cells and monocytes migrate to HIV-
 Tat RGD and basic peptides*. AIDS, 12: 261-268.

- BERBERIAN L., GOODGLICK L., KIPPS T.J., BRAUN J., 1993.
Immunoglobulin V_H3 gene products: natural ligands for HIV gp120. Science, 261: 1588-1591.
- BONECCHI R., SOZZANI S., STINE J.T., LUINI W., D'AMICO G.,
ALLAVENA P., CHANTRY D., MANTOVANI A., 1998. *Divergent effects of interleukin-4 and interferon- γ on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses.* Blood, 92: 2668-2671.
- BRAKE D.A., DEBOUCK C., BIESECKER G., 1990. *Identification of an Arg-Gly-Asp (RGD) cell adhesion site in human immunodeficiency virus type 1 transactivation protein, tat.* J. Cell Biol., 111: 1275-1281.
- BRADDING P., FEATHER I.H., HOWARTH P.H., MUELLER R., ROBERTS J.A., BRITTEN K., BEWS J.P.A., HUNT T.C., OKAYAMA Y., HEUSSER Y., BULLOCK G.R., CHURCH M.K., HOLGATE S.T., 1992. *Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells.* J. Exp. Med., 176: 1381-1386.
- BRADDING P., ROBERTS J.A., BRITTEN K.M., MONTEFORT S., DJUKANOVIC R., MUELLER R., HEUSSER C.H., HOWARTH P.H.,

- HOLGATE S.T., 1994. *Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor- α in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines.* Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 10: 471-480.
- BRUNNER T., HEUSSER C.H., DAHINDEN C.A., 1993. *Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation.* J. Exp. Med., 177: 605-611.
- BURD P.R., THOMPSON W.C., MAX E.E., MILLS F.C., 1995. *Activated mast cells produce interleukin 13.* J. Exp. Med., 181: 1373-1380.
- CASOLARO V., SPADARO G., PATELLA V., MARONE G., 1993. *In vivo characterization of the anti-inflammatory effect of cyclosporin A on human basophils.* J. Immunol., 151: 5563-5573.
- CHANG H.C., SAMANIEGO F., NAIR B.C., BUONAGURO L., ENSOLI B., 1997. *HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic domain.* AIDS., 11: 1421-1431.

- CHEN Y.H., CHRISTIANSEN A., DIERICH M.P., 1995. *HIV-1 gp41 selectively inhibits spontaneous cell proliferation of human cell lines and mitogen- and recall antigen-induced lymphocyte proliferation.* Immunol. Lett., 48: 39-44.
- CHOE H., FARZAN M., SUN Y., SULLIVAN N., ROLLINS B., PONATH P.D., WU L., MACKAY C.R., LAROSA G., NEWMAN W., GERARD N., GERARD C., SODROSKI J., 1996. *The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates.* Cell, 85: 1135-1148.
- CHRISTOPHE T., KARLSSON A., DUGAVE C., RABET M.J., BOULAY F., DAHLGREN C., 2001. *The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A₄ receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2.* J. Biol. Chem., 276: 21585-21593.
- CIRILLO R., TRIGGIANI M., SIRI L., CICCARELLI A., PETTIT G.R., CONDORELLI M., MARONE G., 1990. *Cyclosporin A rapidly inhibits mediator release from human basophils presumably by interacting with cyclophilin.* J. Immunol., 144: 3891-3897.

- CLERICI M., HAKIM F.T., VENZON D.J., BLATT S., HENDRIX C.W., WYNN T.A., SHEARER G.M., 1993. *Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals*. J. Clin. Invest., 91: 759-765.
- CLERICI M., SHEARER G. M., 1993. *A Th1- Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection*. Immunol. Today, 14: 107-111.
- DE PAULIS A., CIRILLO R., CICCARELLI A., CONDORELLI M., MARONE G., 1991. *FK-506, a potent novel inhibitor of the release of proinflammatory mediators from human FcεRI⁺ cells*. J. Immunol., 146: 2374-2381.
- DE PAULIS, A., CICCARELLI A., DE CRESCENZO G., CIRILLO R., PATELLA V., MARONE G., 1996. *Cyclosporin H is a potent and selective competitive antagonist of human basophil activation by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*. J. Allergy Clin. Immunol., 98: 152-164.
- DE PAULIS A., FLORIO G., PREVETE N., TRIGGIANI M., FIORENTINO I., GENOVESE A., MARONE G., 2002. *HIV-1 envelope gp41*

peptides promote migration of human FcεRI⁺ cells and inhibit IL-13 synthesis through interaction with formyl peptide receptors. J. Immunol., 169: 4459-4467.

DE PAULIS A., MINOPOLI G., ARBUSTINI E., DE CRESCENZO G., DAL PIAZ F., PUCCI P., RUSSO T., MARONE G., 1999. *Stem cell factor is localized in, released from, and cleaved by human mast cells.* J. Immunol., 163: 2799-2808.

DEL PRETE G., MAGGI E., PARRONCHI P., CHRETIEN I., TIRI A., MACCHIA D., RICCI M., BANCHEREAU J., DE VRIES J., ROMAGNANI S., 1988. *IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants.* J. Immunol., 140: 4193-4198.

DRAGIC T., LITWIN V., ALLAWAY G.P., MARTIN S.R., HUANG Y., NAGASHIMA K.A., CAYANAN C., MADDON P.J., KOUP R.A., MOORE J.P., PAXTON W.A., 1996. *HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5.* Nature, 381: 667-673.

DURSTIN M., GAO J.L., TIFFANY H.L., MCDERMOTT D., MURPHY P.M., 1994. *Differential expression of members of the N-*

formylpeptide receptor gene cluster in human phagocytes.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 201: 174-179.

EMSON C.L., BELL S.E., JONES A., WISDEN W., MCKENZIE A.N.J.,
1998. *Interleukin (IL)-4-independent induction of immunoglobulin (Ig)E, and perturbation of T cell development in transgenic mice expressing IL-13.* J. Exp. Med., 188: 399-404.

ENSOLI B., BARILLARI G., SALAHUDDIN S.Z., GALLO R.C., WONG-STAAL F., 1990. *Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients.* Nature, 345: 84-86.

FAKOYA A., MATEAR P.M., FILLEY E., ROOK G.A.W., STANFORD J., GILSON R.J.C., BEECHAM N., WELLER I.V.D., VYAKARNAM A., 1997. *HIV infection alters the production of both type 1 and 2 cytokines but does not induce a polarized type 1 or 2 state.* AIDS, 11: 1445-1452.

FAUCI A.S., 1996. *Host factors and the pathogenesis of HIV-infected disease.* Nature, 384: 529-534.

- FENG Y., BRODER C.C., KENNEDY P.E., BERGER E.A., 1996. *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 272: 872-877.
- IORE S., MADDOX J.F., PEREZ H.D., SERHAN C.N., 1994. *Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A₄ receptor*. J. Exp. Med., 180: 253-60.
- FLORIO G., PETRAROLI A., PATELLA V., TRIGGIANI M., MARONE G., 2000. *The immunoglobulin superantigen-binding site of HIV-1 gp120 activates human basophils*. AIDS, 14: 931-8.
- FRANKEL A.D., PABO C.O., 1988. *Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus*. Cell, 55: 1189-1193.
- GALLI S.J., 1993. *New concepts about the mast cell*. N. Engl. J. Med., 328: 257-265.
- GALLI G., ANNUNZIATO F., MAVILIA C., ROMAGNANI P., COSMI L., MANETTI R., PUPILLI C., MAGGI E., ROMAGNANI S., 1998. *Enhanced HIV expression during Th2-oriented responses explained by the opposite regulatory effect of IL-4 and IFN- γ on fusin/CXCR4*. Eur. J. Immunol., 28: 3280-2390.

- GAO J.L., MURPHY P.M., 1993. *Species and subtype variants of the N-formyl peptide chemotactic receptor reveal multiple important functional domains*. J. Biol.Chem., 268: 25395-25401.
- GAYNOR R.B., 1995. *Regulation of HIV-1 gene expression by the transactivator protein Tat*. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 193: 51-77.
- GELDERBLOM H.R., HAUSMANN E.H.S., OZEL M., PAULI G., KOCH M. A., 1987. *Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins*. Virology, 156: 171-176.
- GOODLICK L., ZEVIT N., NESHAT M.S., BRAUN J., 1995. *Mapping the Ig superantigen-binding site of HIV-1 gp120*. J. Immunol., 155: 5151-5159.
- GRAZIOSI C., PANTALEO G., GANTT K.R., FORTIN J.P., DEMAREST J.F., COHEN O.J., SÉKALY R.P., FAUCI A.S., 1994. *Lack of evidence for the dichotomy of T_H1 and T_H2 predominance in HIV-infected individuals*. Science, 265: 248-252.
- GRÜNIG G., WARNOCK M., WAKIL A.E., VENKAYYA R., BROMBACHER F., RENNICK D.M., SHEPPARD D., MOHRS M.,

- DONALDSON D.D., LOCKSLEY R.M., CORRY D.B., 1998. *Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma*. Science, 282: 2261-2263.
- HELLAND D.E., WELLES J.L., CAPUTO A., HASELTINE W.A., 1991. *Transcellular transactivation by the human immunodeficiency virus type 1 tat protein*. J. Virol., 65: 4547-4549.
- ISRAËL-BIET D., LABROUSSE F., TOURANI J.M., SORS H., ANDRIEU J.M., EVEN P., 1992. *Elevation of IgE in HIV-infected subjects: a marker of poor prognosis*. J. Allergy. Clin. Immunol., 89: 68-75.
- KANAGAWA O., VAUPEL B.A., GAYAMA S., KOEHLER G., KOPF M., 1993. *Resistance of mice deficient in IL-4 to retrovirus-induced immunodeficiency syndrome (MAIDS)*. Science, 262: 240-242.
- KARPAS A., LOWDELL M., JACOBSON S.K., HILL F., 1992. *Inhibition of human immunodeficiency virus and growth of infected T cells by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK 506*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 8351-8355.
- KARRAY S., ZOUALI M., 1997. *Identification of the B cell superantigen-binding site of HIV-1 gp120*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 1356-1360.

- KARRAY S., JUOMPAN L., MAROUN R.C., ISENBERG D., SILVERMAN G.J., ZOUALI M., 1998. *Structural basis of the gp120 superantigen-binding site on human immunoglobulins*. J. Immunol., 161: 6681-6688.
- KLEIN S.A., DOBMEYER J.M., DOBMEYER T.S., PAPE M., OTTMAN O.G., HELM E.B., HOELZER D., ROSSOL R., 1997. *Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry*. AIDS, 11: 1111-1118.
- KOUTSONIKOLIS A., HARAGUCHI S., BRIGINO E.N., OWENS U.E., GOOD R.A., DAY N.K., 1997. *HIV-1 recombinant gp41 induces IL-10 expression and production in peripheral blood monocytes but not in T-lymphocytes*. Immunol. Lett., 55: 109-113.
- KOUTSONIKOLIS A., NELSON R.P., FERNANDEZ-CALDAS E., BRIGINO E.N., SELEZNICK M., GOOD R.A., LOCKEY R.F., 1996. *Serum total and specific IgE levels in children infected with human immunodeficiency virus*. J. Allergy. Clin. Immunol., 97: 692-697.
- KOWALSKI M.M., POTZ J., BASIRIPOUR L., DORFMAN T., GOH W.C., TERWILLIGER E., DAYTON A., ROSEN C., HASELTINE W.,

- SODROSKI J., 1987. *Functional regions of envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1*. Science, 237: 1351-1355.
- KWONG P.D., WYATT R., ROBINSON J., SWEET R.W., SODROSKI J., HENDRICKSON W.A., 1998. *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. Nature, 393: 648-659.
- LAFRENIE R.M., WAHL L.M., EPSTEIN J.S., HEWLETT I.K., YAMADA K.M., DHAWAN S., 1996. *HIV-1-Tat protein promotes chemotaxis and invasive behavior by monocytes*. J. Immunol., 157: 974-977.
- LI H., SIM T.C., ALAM R., 1996. *IL-13 released by and localized in human basophils*. J. Immunol., 156: 4833-4838.
- LIANG T.S., GAO J.L., FATEMI O., LAVIGNE M., LETO T.L., MURPHY P.M., 2001. *The endogenous opioid spinorphin blocks fMet-Leu-Phe-induced neutrophil chemotaxis by acting as a specific antagonist at the N- formylpeptide receptors subtype FPR*. J. Immunol., 167: 6609-6614.

- LUCEY D.R., ZAJAC R.A., MELCHER G.P., BUTZIN C.A., BOSWELL R.N., 1990. *Serum IgE levels in 622 persons with human immunodeficiency virus infection: IgE elevation with marked depletion of CD4⁺ T-cells*. AIDS Res. Hum. Retrov., 6: 427-429.
- MACGLASHAN D.Jr., WHITE J.M., HUANG S-K., ONO S.J., SCHROEDER J.T., LICHTENSTEIN L.M., 1994. *Secretion of IL-4 from human basophils. The relationship between IL-4 mRNA and protein in resting and stimulated basophils*. J. Immunol., 152: 3006-3016.
- MAGGI E., MAZZETTI M., RAVINA A., ANNUNZIATO F., DE CARLI M., PICCINNI M.P., MANETTI R., CARBONARI M., PESCE A.M., DEL PRETE G., ROMAGNANI S., 1994. *Ability of HIV to promote a T_H1 to T_H0 shift and to replicate preferentially in T_H2 and T_H0 cells*. Science, 265: 244-248.
- MALAVIYA R., IKEDA T., ROSS E., ABRAHAM S.N., 1996. *Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α* . Nature, 381: 77-80.

- MARONE G., 1985. *The role of basophils and mast cells in the pathogenesis of pulmonary disease*. Int. Archs. Allergy Appl. Immunol., 76 (suppl. 1): 70-82.
- MARONE G., COLUMBO M., TRIGGIANI M., CIRILLO R., GENOVESE A., FORMISANO S., 1987. *Inhibition of IgE-mediated release of histamine and peptide leukotriene from basophils and mast cells by forskolin*. Biochem. Pharmacol., 36: 13-20.
- MARONE G., 1995 a. *Human basophils and mast cells: biological aspects*. Karger, Basel.
- MARONE G., 1995 b. *Human basophils and mast cells: clinical aspects*. Karger, Basel.
- MARONE G., 1998. *Asthma: recent advances*. Immunology Today, 19: 5-9.
- MARONE G., FLORIO G., PETRAROLI A., TRIGGIANI M., DE PAULIS A., 2001. *Role of human $Fc\epsilon RI^+$ cells in HIV-1 infection*. Immunol. Rev., 179: 128-138.
- MARONE G., FLORIO G., PETRAROLI A., DE PAULIS A., 2001. *Dysregulation of the IgE/ $Fc\epsilon RI$ network in HIV-1 infection*. J. Allergy Clin. Immunol., 107: 22-30.

- MARONE G., DE PAULIS A., FLORIO G., PETRAROLI A., ROSSI F.W., TRIGGIANI M., 2001. *Are mast cells MASTers in HIV-1 infection?* Int. Arch. Allergy Immunol., 125: 89-95.
- MARONE G., FLORIO G., PETRAROLI A., TRIGGIANI M., DE PAULIS A., 2000. *Mechanisms of IgE elevation in HIV-1 infection.* Crit. Rev. Immunol., 20: 477-496.
- MARONE G., FLORIO G., PETRAROLI A., TRIGGIANI M., DE PAULIS A., 2001. *Human mast cells and basophils in HIV-1 infection.* Trends Immunol., 22: 229-232.
- MARONE G., LICHTENSTEIN L.M., GALLI S.J., 2000. *Mast Cells and Basophils.* Academic Press, London.
- MCKENZIE G.J., EMSON C.L., BELL S.E., ANDERSON S., FALLON P., ZURAWSKI G., MURRAY R., GRENCIS R., MCKENZIE A.N.J., 1998. *Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice.* Immunity, 9: 423-432.
- MERRILL J.E., KOYANAGI Y., ZACK J., THOMAS L., MARTIN F., CHEN I.S., 1992. *Induction of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in brain cultures by human immunodeficiency virus type 1.* J. Virol., 66: 2217-2225.

- MEYAARD L., OTTO S.A., KEET I.P.M., VAN LIER R.A.W., MIEDEMA F., 1994. *Changes in cytokine secretion patterns of CD4⁺ T-cell clones in human immunodeficiency virus infection*. Blood, 12: 4262-4268.
- MITOLA S., SOZZANI S., LUINI W., PRIMO L., BOSATTI A., WEICH H., BUSSOLINO F., 1997. *Tat-human immunodeficiency virus-1 induces human monocyte chemotaxis by activation of vascular endothelial growth factor receptor-1*. Blood, 90: 1365-1372.
- MOORE J.P. 1997. *Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy*. Science, 276: 51-52.
- MORAWETZ R.A., DOHERTY T.M., GIESE N.A., HARTLEY J.W., MÜLLER W., KÜHN R., RAJEWSKY K., COFFMAN R., MORSE III H.C., 1994. *Resistance to murine acquired immunodeficiency syndrome (MAIDS)*. Science, 265: 264-266.
- OCHENSBERGER B., DAEPP G.C., RIHS S., DAHINDEN C.A., 1996. *Human blood basophils produce interleukin-13 in response to IgE-receptor-dependent and -independent activation*. Blood, 88: 3028-3037.

- OCHENSBERGER B., TASSERA L., BIFRARE D., RIHS S., DAHINDEN C.A., 1999. *Regulation of cytokine expression and leukotriene formation in human basophils by growth factors, chemokines and chemotactic*. Eur. J. Immunol., 29: 11-22.
- OCHI H., HIRANI W.M., YUAN Q., FRIEND D.S., AUSTEN K.F., Boyce J.A., 1999. *T helper cell type 2 cytokine-mediated comitogenic responses and CCR3 expression during differentiation of human mast cells in vitro*. J. Exp. Med., 190: 267-280.
- OSTROWSKI M.A., JUSTEMENT S.J., CATANZARO A., HALLAHAN C.A., EHLE L.A., MIZELL S.B., KUMAR P.N., MICAN J.A., CHUN T.W., FAUCI A.S., 1998. *Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals*. J. Immunol., 161: 3195-3201.
- PAGANELLI R., SCALA E., MEZZAROMA I., PINTER E., D'OFFIZI G., FANALES-BELASIO E., ROSSO R.M., ANSOTEGUI I.J., PANDOLFI F., AIUTI F., 1995. *Immunologic aspects of hyperimmunoglobulinemia E-like syndrome in patients with AIDS*. J. Allergy Clin. Immunol., 95: 995-1003.

- PANTALEO G., GRAZIOSI C., FAUCI A.S., 1993. *The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection.* New Engl. J. Med., 328: 327-335.
- PATELLA V., BOUVET J.-P., MARONE G., 1993. *Protein Fv produced during viral hepatitis is a novel activator of human basophils and mast cells.* J. Immunol., 151: 5685-5698.
- PATELLA V., CASOLARO V., CICCARELLI A., PETTIT G.R., COLUMBO M., MARONE G., 1995.. *The antineoplastic bryostatins affect human basophils and mast cells differently.* Blood, 85: 1272-1281.
- PATELLA V., GIULIANO A., BOUVET J.-P., MARONE G., 1998. *Endogenous superallergen protein Fv induces IL-4 secretion from human FcεRI⁺ cells through interaction with the V_H3 Region of IgE.* J. Immunol., 161: 5647-5655.
- PATELLA V., GIULIANO A., FLORIO G., BOUVET J.-P., MARONE G., 1999. *Endogenous superallergen protein Fv interacts with the V_H3 region of IgE to induce cytokine secretion from human basophils.* Int. Arch. Allergy Immunol., 118: 197-199.

- PATELLA V., FLORIO G., ORIENTE A., SPADARO G., FORTE V., GENOVESE A., MARONE G., 2000. *Human mast cells and basophils in immune response to infectious agents*. In: G. Marone, L. M. Lichtenstein, S. J. Galli (ed.), *Mast Cells and Basophils*. Academic Press, London: 397-418.
- PATELLA V., FLORIO G., PETRAROLI A., MARONE G., 2000. *HIV-1 gp120 induces IL-4 and IL-13 release from human FcεRI⁺ cells through interaction with the V_H3 region of IgE*. J. Immunol., 164: 589-595.
- PAWANKAR R., OKUDA M., YSSEL H., OKUMURA K., RA C., 1997. *Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the FcεRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells*. J. Clin. Invest., 99: 1492-1499.
- PEDERSEN M., NIELSEN C.M., PERMIN H., 1991. *HIV antigen-induced release of histamine from basophils from HIV infected patients*. Allergy, 46: 206-212.
- PENN M.L., GRIVEL J.-C., SCHRAMM B., GOLDSMITH M.A., MARGOLIS L., 1999. *CXCR4 utilization is sufficient to trigger*

CD4+ T cell depletion in HIV-1-infected human lymphoid tissue.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 633-638.

PLAUT M., MARONE G., GILLESPIE E., 1983. *The role of cyclic AMP in modulating cytotoxic T lymphocytes II. Sequential changes during culture in responsiveness of cytotoxic lymphocytes to cyclic AMP-active agents.* J. Immunol., 131: 2945-2952.

PREMACK B.A., SCHALL T.J., 1996. *Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection.* Nat. Med., 2: 1174-1178.

PRODEUS A.P., ZHOU X., MAURER M., GALLI S.J., CARROLL M.C., 1997. *Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice.* Nature, 390: 172-175.

RANCINAN C., MORLAT P., CHENE G., GUEZ S., BAQUEY A., BEYLOT J., SALAMON R., 1998. *IgE serum level: a prognostic marker for AIDS in HIV-infected adults.* J. Allergy Clin. Immunol., 102: 329-330.

ROMAGNANI S., 1994. *Lymphokine production by human T cells in disease states.* Annu. Rev. Immunol., 12: 227-257.

ROMAGNANI P., DE PAULIS A., BELTRAME C., ANNUNZIATO F., DENTE V., MAGGI E., ROMAGNANI S., MARONE G., 1999. *Tryptase-chymase double-positive human mast cells express the*

eotaxin receptor CCR3 and are attracted by CCR3-binding chemokines. Am. J. Pathol., 155: 1195-1204.

SECORD E.A., KLEINER G.I., AUCI D.L., SMITH-NOROWITZ T., CHICE S., FINKIELSTEIN A., NOWAKOWSKI M., FIKRIG S., DURKIN G., 1996. *IgE against HIV proteins in clinically healthy children with HIV disease. J. Allergy. Clin. Immunol., 98: 979-984.*

SHOR-POSNER G., MIGUEZ-BURBANO M.J., LU Y., FEASTER D., FLETCHER M.A., SAUBERLICH H., BAUM M.K., 1995. *Elevated IgE level in relationship to nutritional status and immune parameters in early human immunodeficiency virus-1 disease. J. Allergy. Clin. Immunol., 95: 886-892.*

SILVERMAN G. J., 1997. *B-cell superantigens. Immunol. Today, 18: 379-386.*

SIRAGANIAN R.P., 1974. *An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. Analytical Biochemistry, 57: 383-394.*

SOZZANI S., ZHOU D., LOCATI M., RIEPPI M., PROOST P., MAGAZIN M., VITA N., VAN DAMME J., MANTOVANI A., 1994. *Receptors and transduction pathways for monocyte chemotactic protein-2*

and monocyte chemotactic protein-3. Similarities and differences with MCP-1. J. Immunol. 152: 3615-3622.

STELLATO C., DE PAULIS A., CICCARELLI A., CIRILLO R., PATELLA V., CASOLARO V., MARONE G., 1992. *Anti-inflammatory effects of cyclosporin A on human skin mast cells.* J. Invest. Dermatol. 98: 800-804.

SU S.B., GAO J., GONG W., DUNLOP N.M., MURPHY P.M., OPPENHEIM J.J., WANG J.M., 1999. *T21/DP107, A syntetic leucin zipper-like domain of the HIV-1 envelope gp41, attracts and activates human phagocytes by using G-protein-coupled formyl peptide receptors.* J. Immunol., 162: 5924-5930.

SU S.B., GONG W.H., GAO J.L., SHEN W.P., GRIMM M.C., DENG X., MURPHY P.M., OPPENHEIM J.J., Wang J.M., 1999. *T20/DP178, an ectodomain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41, is an activator of human phagocyte N-formyl peptide receptor.* Blood, 93: 3885-3892.

TAKESHITA S., BREEN E.C., IVASHCHENKO M., NISHANIAN P.G., KISHIMOTO T., VREDEVOE D.L., MARTINEZ-MAZA O., 1995. *Induction of IL-6 and IL-10 production by recombinant HIV-1*

envelope glycoprotein 41 (gp41) in the THP-1 human monocytic cell line. Cell. Immunol., 165: 234-242.

THALI M., BUKOVSKY A., KONDO E., ROSENWIRTH B., WALSH C.T., SODROSKI J., GOTTLINGER H. G., 1994. *Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions.* Nature, 372: 363-365.

THOMAS K.M., PYUN H.Y., NAVARRO J., 1990. *Molecular cloning of the fMet-Leu-Phe receptor from neutrophils.* J. Biol. Chem., 265: 20061-20064.

TOSI G., DE LERMA-BARBARO A., D'AGOSTINO A., VALLE M.T., MEGIOVANNI A.M., MANCA F., CAPUTO A., BARBANTI-BRODANO G., ACCOLLA R.S., 2000. *HIV-1 Tat mutants in the cysteine-rich region down-regulate HLA-class II expression in T lymphocytic and macrophage cell lines.* Eur. J. Immunol., 30: 19-28.

TRIGGIANI M., ORIENTE A., SEEDS C.M., BASS A.D., MARONE G., CHILTON F.H., 1995. *Migration of human inflammatory cells into the lung induces the remodeling of arachidonic acid into a triglyceride pool.* J. Exp. Med., 182: 1181-1190.

UGUCCIONI, M., MACKAY C.R., OCHENSBERGER B., LOETSCHER P., RHIS S., LAROSA G.J., RAO P., PONATH P.D., BAGGIOLINI M.,

- DAHINDEN C.A.,1997. *High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines.* J. Clin. Invest., 100: 1137-1143.
- VIGANÒ A., PRINCIPI N., CRUPI L., ONORATO J., ZUCCOTTI G.V., SALVAGGIO A., 1995. *Elevation of IgE in HIV-infected children and its correlation with the progression of disease.* J. Allergy. Clin. Immunol., 95: 627-632.
- VIGORITO C., POTO S., PICOTTI G.B., TRIGGIANI M., MARONE G., 1986. *Effects of activation of the H₁ receptor on coronary hemodynamics in man.* Circulation, 73: 1175-1182.
- VOGEL B.E., LEE S.J., HILDEBRAND A., CRAIG W., PIERSCHBACHER M.D., WONG-STAAAL F., RUOSLAHTI E., 1993. *A novel integrin specificity exemplified by binding of the alpha v beta 5 integrin to the basic domain of the HIV Tat protein and vitronectin.* J. Cell. Biol., 121: 461-468.
- WENZEL-SEIFERT K., HURT C.M., SEIFERT R., 1998. *High constitutive activity of the human formyl peptide receptor.* J. Biol. Chem., 273: 24181-24189.

- WESTENDORP M.O., FRANK R., OCHSENBAUER C., STRICKER K.,
DHEIN J., WALCZAK H., DEBATIN K.M., KRAMMER P.H., 1995.
*Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1
Tat and gp120.* Nature, 375: 497-500.
- WILLS-KARP M., LUYIMBAZI J., XU X., SCHOFIELD B., NEBEN T.Y.,
KARP C.L., DONALDSON D.D., 1998. *Interleukin-13: central
mediator of allergic asthma.* Science, 282: 2258-2261.

Legenda delle Figure

Figura 1

- A Analisi dell'espressione dell'mRNA per IL-4 con tecnica di RT-PCR quantitativa in basofili umani stimolati con anti-IgE (0.3 µg/ml) o gp120 (30 nM). L'mRNA per IL-4 è stato amplificato con una RT-PCR quantitativa. Il cDNA sottoposto ad elettroforesi è stato visualizzato con bromuro di etidio. In assenza di cDNA (No RT) o di acido nucleico (No Nucleic Ac.), nessun prodotto era visualizzato dalla PCR.
- B Effetti dell'anti-IgE e della gp120 sui livelli extracellulari di IL-4 e sul rilascio di istamina dai basofili rispetto a cellule non stimulate. I basofili purificati (> 98%) ottenuti da donatori sani negativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2 sono stati preincubati (16 h at 37°C) con IL-3 ricombinante umana (10 ng/ml), e, al termine

del'incubazione con IL-3, lavati e incubati con o senza anti-IgE (1 µg/ml) o gp120 (30 nM) per 4 h a 37°C.

Figura 2

Effetti di varie concentrazioni di gp120 ottenuta da quattro differenti cladi virali sulla secrezione di IL-4 da basofili umani purificati da sangue periferico di donatori sani negativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Ogni punto rappresenta la media del rilascio di IL-4 ottenuta da incubazioni in duplicato.

Figura 3

- A Cinetica della secrezione di IL-13, IL-4 e di istamina indotta da gp120 (30 nM) nei basofili umani. Ciascun punto rappresenta la media del rilascio di IL-13, IL-4 e istamina ottenuta da incubazioni in duplicato.

- B secrezione di IL-13, IL-4 e di istamina indotta da gp120 (30 nM) nei basofili umani. Ciascun punto rappresenta la

media del rilascio di IL-13, IL-4 e istamina ottenuta da incubazioni in duplicato.

Figura 4

A Effetti dell'inibizione di varie concentrazioni di Ciclosporina A (24-800 nM) sulle secrezioni di Istamina e di IL-4 indotte da gp120. Ogni barra rappresenta la media del rilascio di Istamina o di IL-4 ottenuta da incubazioni in duplicato.

B Effetti dell'inibizione di varie concentrazioni di FK-506 (1-30 nM) sulle secrezioni di Istamina e di IL-4 indotte da gp120. Ogni barra rappresenta la media del rilascio di Istamina o di IL-4 ottenuta da incubazioni in duplicato.

Figura 5

Effetti dell'acido lattico sul rilascio di IL-4, da basofili umani, indotto da gp120 e anti-Ige. Le cellule purificate da sangue periferico di donatori sani negativi per

anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2 sono state trattate con buffer o con acido lattico (0.01 M; pH 3.9), 5 min a 22°C e quindi lavate. I leucociti sono stati incubati (4h a 37°C) con gp120 (3 nM), anti-IgE (0.3 µg/ml), o anti-FcεRI (0.3 µg/ml). Ciascuna barra rappresenta del rilascio di IL-4 da incubazioni in duplicato.

Figura 6

Effetto della preincubazione di gp120 con IgM monoclonali sul rilascio di IL-4 da basofili umani. La gp120 (30 nM) è stata preincubata per 15 min a 37° C con concentrazioni crescenti di IgM monoclonali umane, IgM M11, IgM M3, IgM LAN (V_H3^+) o IgM M14 (V_H6^+). Al termine i basofili sono stati incubati per ulteriori 4 h a 37°C. Ogni barra rappresenta la percentuale di inibizione media del rilascio di IL-4 da incubazioni in duplicato.

Figura 7

Effetto della preincubazione di gp120 con IgM monoclonali sul rilascio di Istamina da basofili umani. La gp120 (30 nM) è stata preincubata per 15 min a 37° C con concentrazioni crescenti di IgM monoclonali umane, IgM M11, IgM M3, IgM LAN (V_H3^+) o IgM M14 (V_H6^+). Ogni punto rappresenta la percentuale di inibizione media del rilascio di Istamina da incubazioni in duplicato.

Figura 8

Effetto dei peptidi di gp41 di HIV-1 e di FMLP sulla chemiotassi dei basofili isolati e purificati dal sangue di donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2. I basofili erano incubati nella camera di Boyden per la chemiotassi con peptidi di gp41 ($5 \times 10^{-7} M$) o con FMLP ($5 \times 10^{-7} M$) per 1 ora a 37°C in un incubatore con CO₂ al 5%. I valori rappresentano la media \pm SEM ottenuti da sei esperimenti effettuati con preparazioni

cellulari isolate da donatori differenti. *, $p < 0,01$ rispetto al controllo.

Figura 9

- A Effetto di CsH sulla chemiotassi dei basofili umani indotta da FMLP ($5 \times 10^{-7} \text{M}$) e dal peptide 2019 di gp41 ($5 \times 10^{-7} \text{M}$). I basofili, isolati e purificati dal sangue di donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2, erano preincubati (5 min a 37°C) con CsH o buffer. I basofili erano incubati nella camera di Boyden per la chemiotassi con il peptide 2019 di gp41 ($5 \times 10^{-7} \text{M}$) o con FMLP ($5 \times 10^{-7} \text{M}$) per 1 ora a 37°C in un incubatore con CO_2 al 5%. I valori rappresentano la media \pm SEM ottenuta da tre esperimenti effettuati con preparazioni cellulari isolate da donatori differenti. *, $p < 0,01$ rispetto al controllo.
- B Effetto di CsH sulla chemiotassi dei basofili umani indotta da FMLP ($5 \times 10^{-7} \text{M}$) e dal peptide 2021 di gp41

($5 \times 10^{-7} \text{M}$). I basofili, isolati e purificati dal sangue di donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2, erano preincubati (5 min a 37°C) con CsH o buffer. I basofili erano incubati nella camera di Boyden per la chemiotassi con il peptide 2021 di gp41 ($5 \times 10^{-7} \text{M}$) o con FMLP ($5 \times 10^{-7} \text{M}$) per 1 ora a 37°C in un incubatore con CO_2 al 5%. I valori rappresentano la media \pm SEM ottenuta da tre esperimenti effettuati con preparazioni cellulari isolate da donatori differenti. *, $p < 0,01$ rispetto al controllo.

Figura 10

A Effetti della cross-desinsibilizzazione tra basse concentrazioni di FMLP ($5 \times 10^{-7} \text{M}$) ed il peptide 2019 di gp41 ($5 \times 10^{-7} \text{M}$) sulla chemiotassi dei basofili umani. I basofili, isolati e purificati dal sangue di donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2, erano incubati in buffer PIPES contenente EDTA (4mM), con FMLP ($5 \times 10^{-7} \text{M}$) o con il peptide 2019 di gp41

($5 \times 10^{-7} \text{M}$) per 30 min a 37°C . Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate, risospese in PACGM e sottoposte a stimoli chemiotattici, FMLP ($5 \times 10^{-7} \text{M}$) o con il peptide 2019 di gp41 ($5 \times 10^{-7} \text{M}$). I basofili erano incubati nella camera di Boyden per la chemiotassi per 1 ora a 37°C in un incubatore con CO_2 al 5%. I valori rappresentano la media \pm SEM di determinazioni triple. *, $p < 0,01$ rispetto ad FMLP; **, $p < 0,01$ rispetto a gp41(2019).

B Effetti della cross-desinsibilizzazione con alte concentrazioni di FMLP (10^{-4}M) sulla chemiotassi dei basofili umani. I basofili, isolati e purificati dal sangue di donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2, erano incubati in buffer PIPES contenente EDTA (4mM) o con FMLP (10^{-4}M) per 30 min a 37°C . Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate, risospese in PACGM e sottoposte a stimoli con il peptide 2019 o 2021 di gp41 ($5 \times 10^{-7} \text{M}$). I basofili erano

incubati nella camera di Boyden per la chemiotassi per 1 ora a 37°C in un incubatore con CO₂ al 5%. I valori rappresentano la media \pm SEM di determinazioni triple. *, p< 0,01 rispetto a 2019 di gp41; **, p< 0,01 rispetto a 2021 digp41(2019).

Figura 11

Effetti di concentrazioni ottimali (10^{-6} M) dei peptidi di gp41 di HIV-1 sul rilascio di istamina indotto da FMLP (10^{-6} M) su basofili isolati e purificati dal sangue di donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Le cellule sono state preincubate (60 min a 37°C) con peptidi di gp41 e quindi incubate con concentrazione ottimale di FMLP (10^{-6} M). I valori rappresentano la media \pm SEM ottenuta da quattro esperimenti effettuati con preparazioni cellulari isolate da donatori differenti. *, p< 0,01 rispetto a FMLP.

Figura 12

Effetti dei peptidi 2019 e 2021 di gp41 di HIV-1 in relazione al tempo di preincubazione. Le cellule sono state preincubate con i peptidi 2019 o 2021 (10^{-6} M) per 15, 35, o 60 min e quindi incubate (30 min a 37°C) con FMLP (10^{-6} M). I valori rappresentano la media \pm SEM della percentuale di inibizione ottenuta da tre esperimenti in cui FMLP induceva un rilascio del $40.2 \pm 6.3\%$ del contenuto totale di istamina. *, $p < 0,01$ rispetto al rilascio di istamina indotto da FMLP.

Figura 13

Effetti di diverse concentrazioni (10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M) dei peptidi 2019 e 2021 di gp41 di HIV-1 sul rilascio di istamina indotto da anti-IgE su basofili isolati e purificati dal sangue di donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Le cellule sono state preincubate (60 min a 37°C) con peptidi 2019 e 2021 di gp41 e quindi incubate (30 min a 37°C) con

concentrazione ottimale (0.1µg/ml) di anti-IgE. I valori sono la media di determinazioni in duplicato.

Figura 14

- A Effetti di diverse concentrazioni (da 10^{-8} a 3×10^{-7} M) del peptide 2019 di gp41 di HIV-1 sul rilascio di istamina indotto da FMLP su basofili isolati e purificati dal sangue di donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Le cellule sono state preincubate (60 min a 37°C) con peptide 2019 di gp41 e quindi incubate (30 min a 37°C) con concentrazioni crescenti di FMLP. I valori sono la media di determinazioni in duplicato.
- B Effetti di diverse concentrazioni (da 10^{-8} a 3×10^{-7} M) del peptide 2021 di gp41 di HIV-1 sul rilascio di istamina indotto da FMLP su basofili isolati e purificati dal sangue di donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Le cellule sono state preincubate (60 min a 37°C) con peptide 2021 di gp41 e quindi incubate (30

min a 37°C) con concentrazioni crescenti di FMLP. I valori sono la media di determinazioni in duplicato.

Figura 15

Effetti del peptide 2021 di gp41 di HIV-1 sull'espressione di mRNA per IL-13 indotta da FMLP nei basofili umani. Le cellule sono state preincubate (60 min a 37°C) con peptide 2021 (10^{-6} M) di gp41. Successivamente è stato aggiunto FMLP (10^{-6} M). I basofili sono stati incubati per 18h a 37°C. la trascrizione di mRNA per IL-13 è stata analizzata con metodica di RT-PCR.

Figura 16

A Effetti di diverse concentrazioni (da 10^{-8} a 10^{-6} M) del peptide 2019 di gp41 di HIV-1 sulla secrezione di IL-13 indotta da FMLP su basofili isolati e purificati dal sangue di donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Le cellule sono state preincubate (60 min a

37°C) con peptide 2019 di gp41. Successivamente è stato aggiunto FMLP (10^{-6} M). I basofili sono stati incubati per 18h a 37°C. I valori sono la media di determinazioni in duplicato ottenuta da tre diversi esperimenti.

B Effetti di diverse concentrazioni (da 10^{-8} a 10^{-6} M) del peptide 2021 di gp41 di HIV-1 sulla secrezione di IL-13 indotta da FMLP su basofili isolati e purificati dal sangue di donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Le cellule sono state preincubate (60 min a 37°C) con peptide 2021 di gp41. Successivamente è stato aggiunto FMLP (10^{-6} M). I basofili sono stati incubati per 18h a 37°C. I valori sono la media di determinazioni in duplicato ottenuta da tre diversi esperimenti.

Figura 17

A Effetto di concentrazioni crescenti di Tat sulla chemiotassi dei basofili isolati e purificati dal sangue di donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-

HIV-2. I basofili erano incubati nella camera di Boyden per la chemiotassi con le concentrazioni di Tat indicate per 1 ora a 37°C in un incubatore con CO₂ al 5%. I valori rappresentano la media \pm SEM ottenuti da sei esperimenti effettuati con preparazioni cellulari isolate da donatori differenti. *, $p < 0,01$ rispetto al controllo.

B Effetto di concentrazioni crescenti di eotassina, RANTES e Tat sulla chemiotassi dei basofili. I basofili isolati e purificati dal sangue di donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2, erano incubati nella camera di Boyden per la chemiotassi, con le concentrazioni indicate di eotassina, di RANTES e di Tat, per 1 ora a 37°C in un incubatore con CO₂ al 5%. I valori rappresentano la media \pm SEM ottenuti da sei esperimenti effettuati con preparazioni cellulari isolati da donatori differenti.

Figura 18

Effetto della proteina Tat sulla mobilitazione del Ca^{++} intracellulare nei basofili. La proteina Tat (60 nM), induce nei basofili umani purificati dal sangue di donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2, un rapido e transitorio aumento del Ca^{++} intracellulare. Il pattern di mobilitazione del Ca^{++} causato da Tat è tipico delle chemochine, come mostrato dal controllo positivo effettuato con eotassina (100 nM).

Figura 19

- A La risposta chemiotattica dei basofili umani alla proteina Tat (60 nM) o dell'FMLP (100 nM) incubati con o senza anti-CCR3 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aggiunto alla sospensione cellulare 10 minuti prima di caricarla nella camera di chemiotassi. I valori rappresentano la media \pm SEM di tre diversi esperimenti effettuati con basofili umani isolati da differenti donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2.

*, $p < 0,01$ rispetto ai basofili preincubati con l'anticorpo anti-CCR3.

B Effetto chemiotattico di Tat, eotassina o RANTES sui basofili umani incubati con o senza aggiunta di anti-CCR3 (5 $\mu\text{g/ml}$) aggiunto alla sospensione cellulare 10 minuti prima che fosse posta nella camera di chemiotassi. I basofili erano incubati in presenza delle concentrazioni indicate di Tat, eotassina e RANTES per 1 ora a 37°C in un incubatore con CO₂ al 5%. I valori indicati rappresentano la media \pm SEM ottenuti da tre diversi esperimenti effettuati con basofili umani isolati da differenti donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2.

*, $p < 0,01$ rispetto ai basofili preincubati con l'anticorpo anti-CCR3.

Figura 20

Effetto di anticorpi monoclonali specifici per diversi epitopi della proteina virale Tat sulla chemiotassi dei basofili in risposta a Tat (60 nM). Le cellule sono state incubate con o senza l'anticorpo monoclonale 6.3G12 (20 µg/ml) diretto contro un epitopo conformazionale della proteina Tat (anti-Tat¹⁻⁸⁶) o l'anticorpo monoclonale 6.15F4 (20 µg/ml) diretto contro l'epitopo RRQR della regione basica di Tat (anti-Tat⁴⁶⁻⁶⁰) aggiunti alla sospensione cellulare 10 minuti prima che fosse posta nella camera di chemiotassi. I valori indicati rappresentano la media \pm SEM ottenuti da tre diversi esperimenti effettuati con basofili umani isolati da differenti donatori sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2.

*, $p < 0,01$ rispetto al controllo rappresentato dai basofili preincubati con l'anticorpo anti-Tat¹⁻⁸⁶.

Figura 21

Effetto della cross-desensibilizzazione tra Tat e l'eotassina sui basofili umani. I basofili ottenuti da donatori sani sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 anti-HIV-2, sono stati incubati per 30 minuti a 37°C con PIPES contenente EDTA o la proteina Tat (60 nM), oppure l' eotassina (100 nM) nello stesso tampone per 30 min a 37°C. Alla fine dell'incubazione, i basofili sono stati lavati (2x), risospesi nel tampone PAGMC e stimolati con Tat (60 nM), eotassina (100 nM), oppure FMLP (10^{-8} M). I valori mostrati rappresentano la media \pm SEM di tre diversi esperimenti effettuati con sospensioni cellulari ottenute da diversi donatori.

*, $p < 0,01$ rispetto ai basofili incubati in assenza di stimoli chemiottattici.

Figura 22

Desensibilizzazione fra Tat ed eotassina sui flussi di Ca^{++} intracellulari. I basofili sono stati marcati con fura-2 come descritto nei Materiali e Metodi e successivamente stimolati con Tat (60 nM), eotassina (100 nM) e ionomicina (20 μM). Vengono presentati i risultati di un tipico esperimento.

Figura 23

Effetto della proteina Tat sull'espressione di CCR3 sulla superficie dei basofili umani. I basofili purificati (>98%) sono stati incubati con gli anticorpi monoclonali anti-CCR3 e anti-Fc ϵ RI oppure con controlli isotipici, seguiti da una seconda incubazione con anticorpi secondari marcati con fluorocromo di tipo PE o FITC. E' stato posto un gate per le cellule Fc ϵ RI⁺ ed è stata quindi analizzata l'espressione di CCR3 su tali cellule. E' mostrata l'espressione di CCR3 sulle cellule prima (area bianca) e dopo 12 ore di incubazione (area grigia). Il

controllo isotipico è indicato dalla curva tratteggiata. I basofili sono stati incubati con buffer (A), la proteina Tat da sola (60 nM; B) oppure in aggiunta all'anticorpo anti-Tat¹⁻⁸⁶ (20 µg/ml; C). Il risultato mostrato è rappresentativo di tre diversi esperimenti eseguiti con analoghi risultati.

Figura 24

Cinetica di espressione dell'mRNA di CCR3 indotta dalla proteina Tat sui basofili. I basofili sono stati incubati per 6 e 12 ore con la proteina Tat (60 nM). L'mRNA trascritto è stato quindi analizzato con tecnica RT-PCR

Figura 25

A Effetto della IL-3 (10 ng/ml) e di concentrazioni progressivamente crescenti della proteina Tat (6-60 nM) da sole e in combinazione, sul rilascio d'istamina dai basofili umani ottenuti da donatori sani sieronegativi per

anticorpi anti-HIV-1 anti-HIV-2. Le cellule sono state preincubate per 30 minuti a 37°C con IL-3 e quindi stimulate (45 minuti a 37°C) con la proteina Tat. I valori mostrati rappresentano la media \pm SEM di quattro esperimenti effettuati con diverse preparazioni cellulari.

B Effetto della IL-3 (10 ng/ml) e di concentrazioni progressivamente crescenti di eotassina (1-100 nM) da sole o in combinazione sul rilascio di istamina dai basofili umani. Le cellule sono state preincubate con IL-3 per 30 minuti a 37°C e quindi stimulate con eotassina per 45 minuti a 37°C. I valori mostrati rappresentano la media \pm SEM di quattro esperimenti effettuati con preparazioni cellulari ottenute da differenti donatori sani sieronegativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2.

Figura 26

Effetto di concentrazioni crescenti di Tat sulla chemiotassi dei mastociti polmonari umani. La

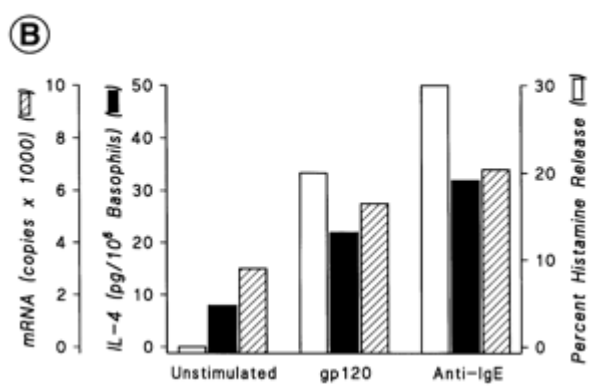
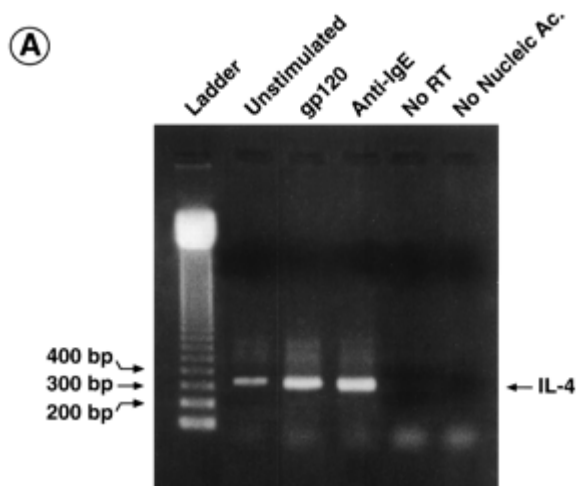
sospensione di mastociti polmonari è stata posta nella camera di chemiotassi con le concentrazioni indicate di Tat e quindi incubata per 3 ore a 37°C in un incubatore al 5% di CO₂. I valori mostrati rappresentano la media \pm SEM di quattro esperimenti effettuati con sospensioni cellulari ottenute da donatori sieronegativi per anticorpi anti HIV-1 e anti-HIV-2.

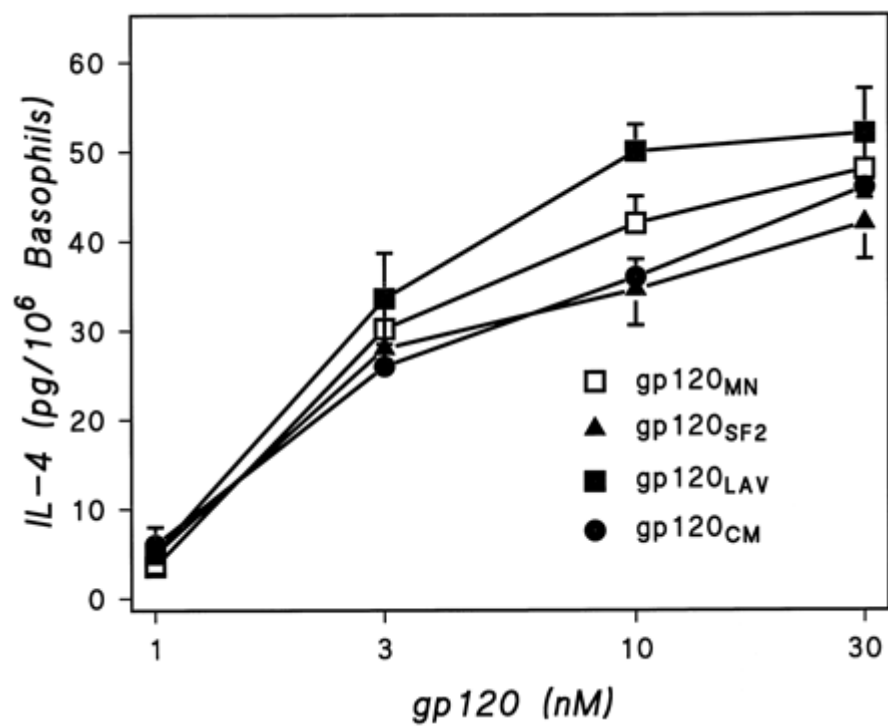
*, $p < 0,01$ rispetto al controllo.

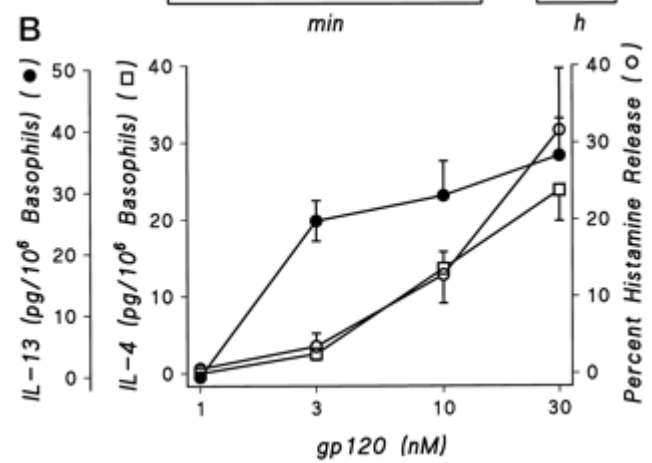
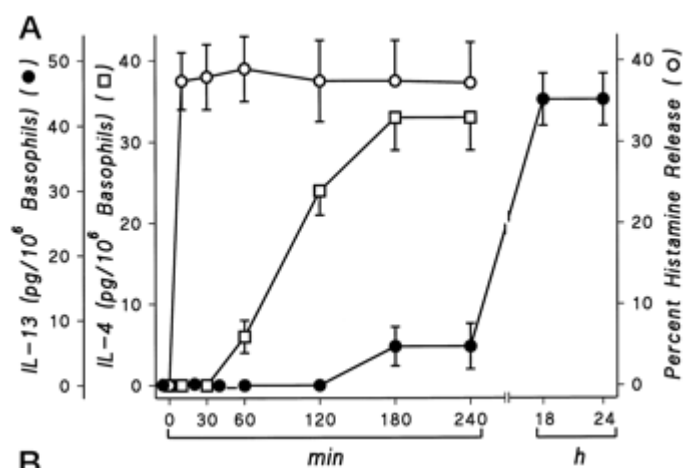
Figura 27

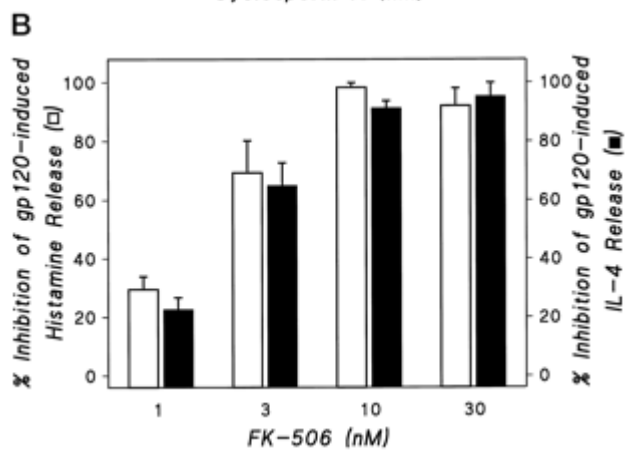
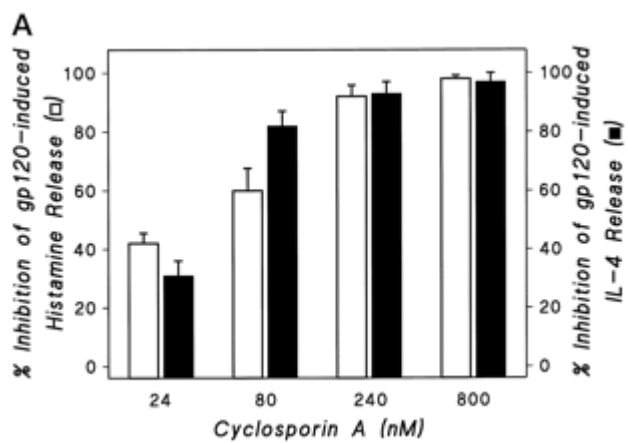
Rappresentazione schematica del meccanismo attraverso il quale il virus HIV-1 e le sue proteine potrebbero influenzare la polarizzazione TH2 e la sintesi di IgE interagendo con il recettore Fc ϵ RI⁺ dei basofili e dei mastociti umani. Nelle fasi iniziali dell'infezione da HIV-1 la gp120 libera o legata al virus interagisce con le IgE V_H3⁺ delle cellule Fc ϵ RI⁺. Questa interazione induce il rilascio di IL-4 e di IL-13 favorendo uno shift verso un fenotipo di tipo T_H2 dove il virus si replica

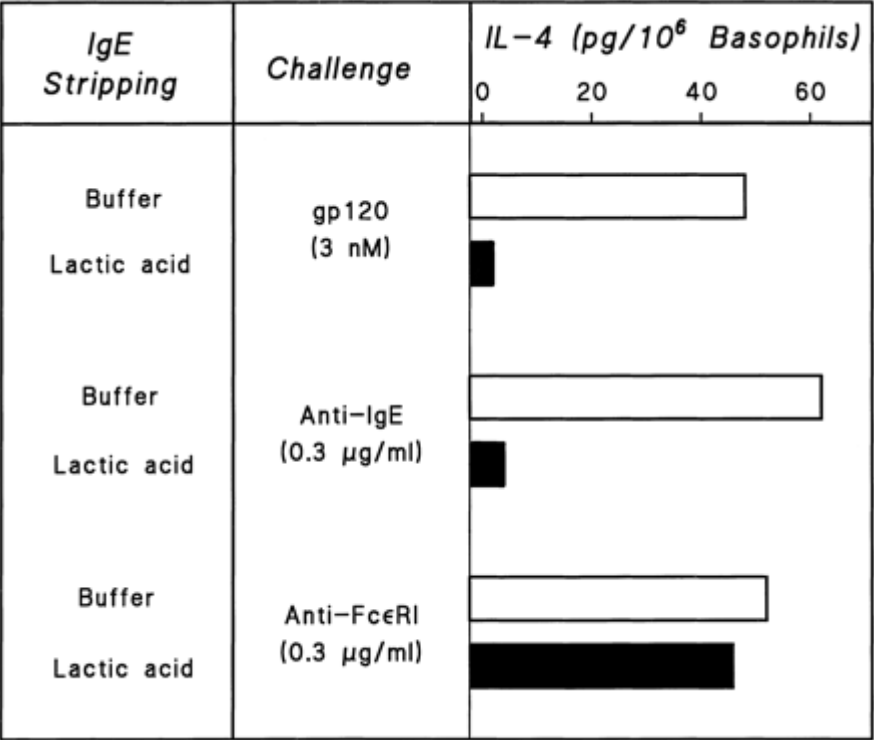
preferenzialmente. La proteina Tat di HIV-1 è secreta dalle cellule infette ed è un potente stimolo chemiotattico per basofili e mastociti interagendo con il recettore di superficie CCR3 per le chemochine. La preincubazione con la proteina Tat up-regola il livello di mRNA per CCR3 e l'espressione del recettore di superficie per CCR3. La proteina Tat extracellulare potrebbe influenzare, inoltre, il rilascio di IL-4 e di IL-13 dalle cellule $Fc\epsilon RI^+$. E' possibile dunque che le cellule umane $Fc\epsilon RI^+$ potrebbero essere infettate, in alcune condizioni, dal virus HIV-1.

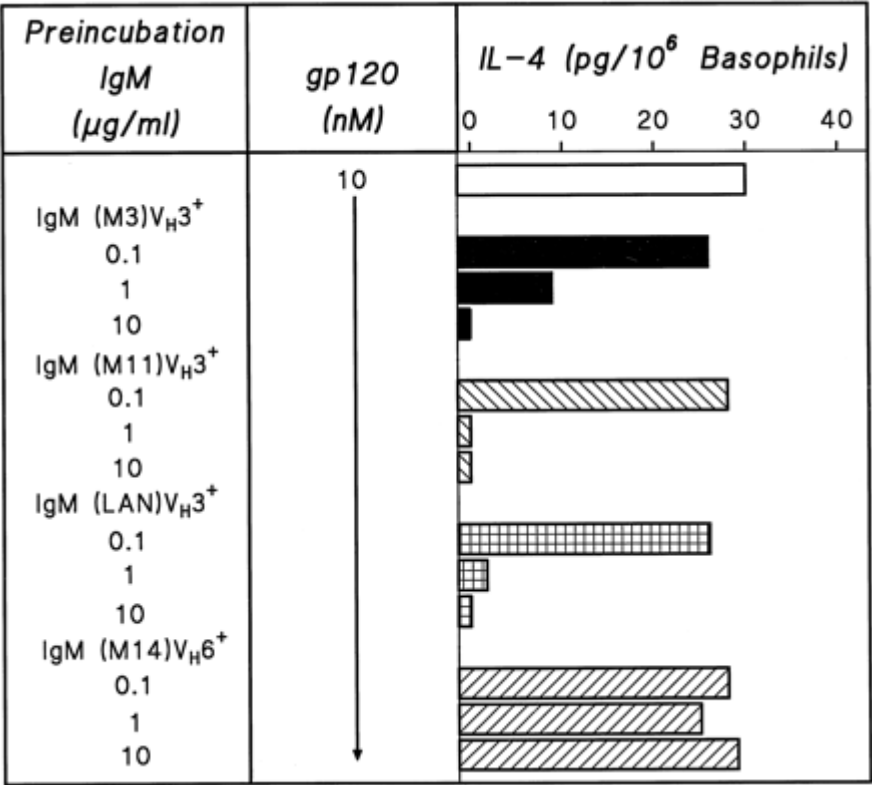


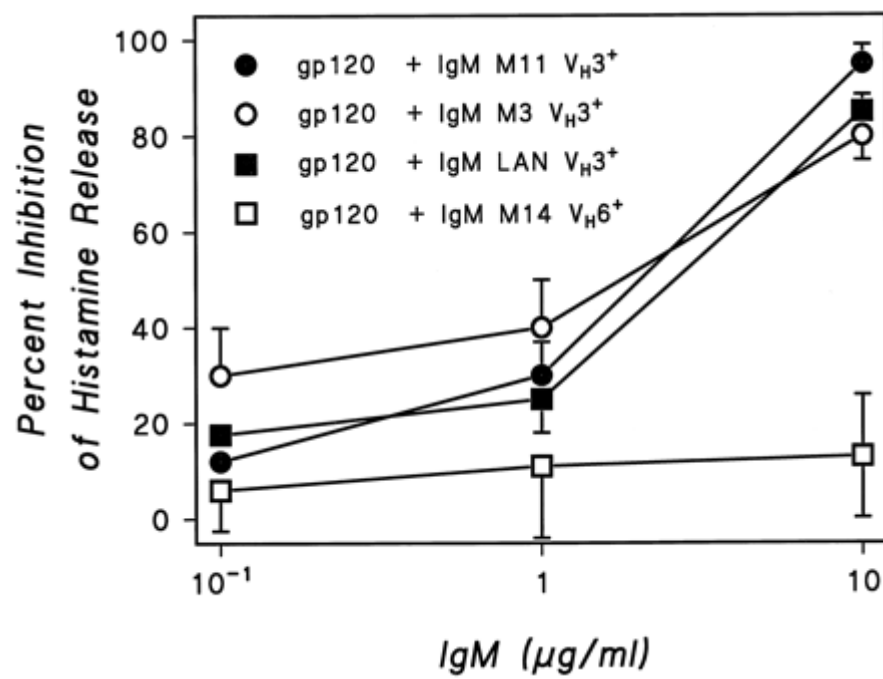


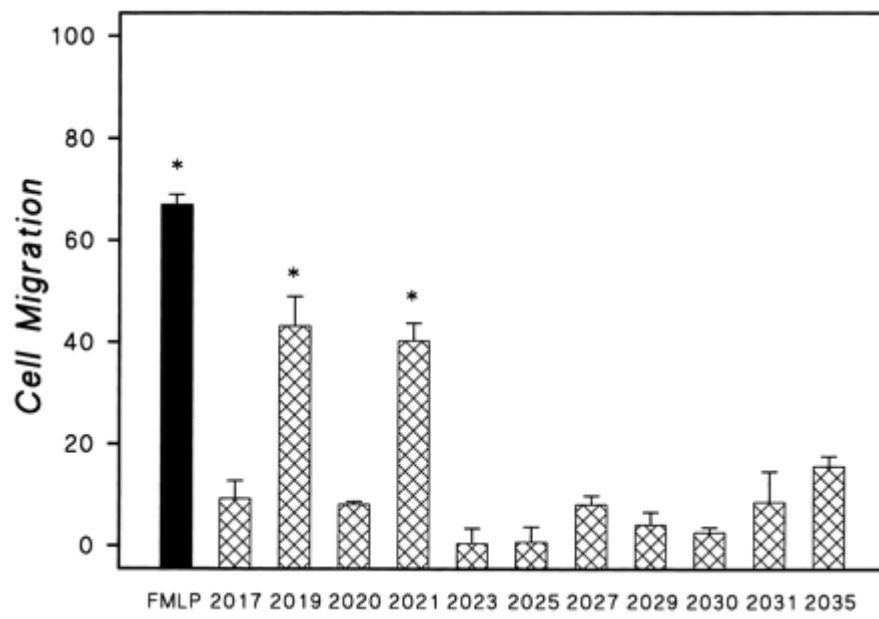




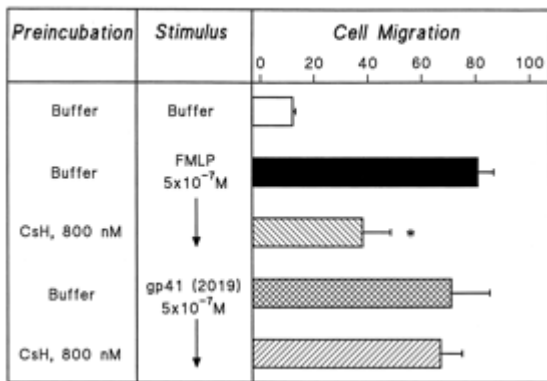




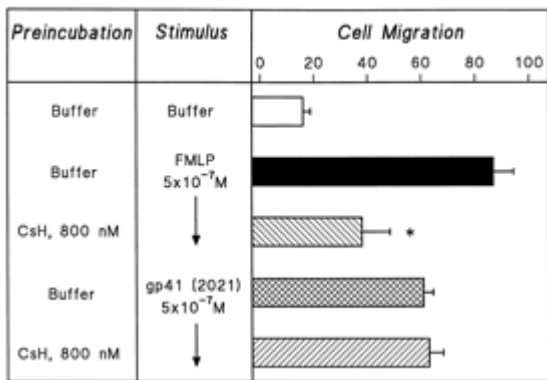




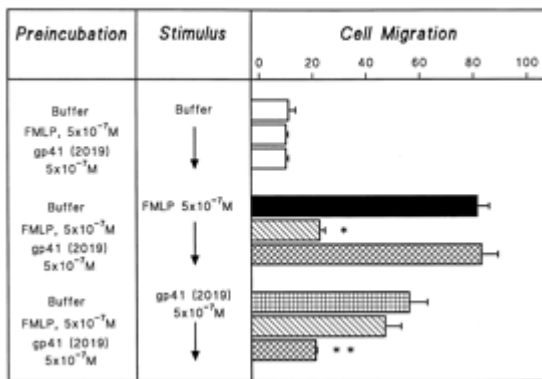
A



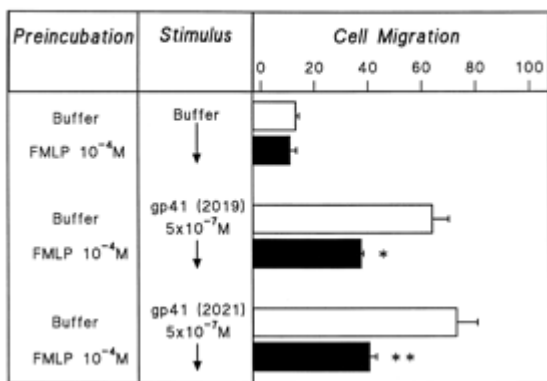
B

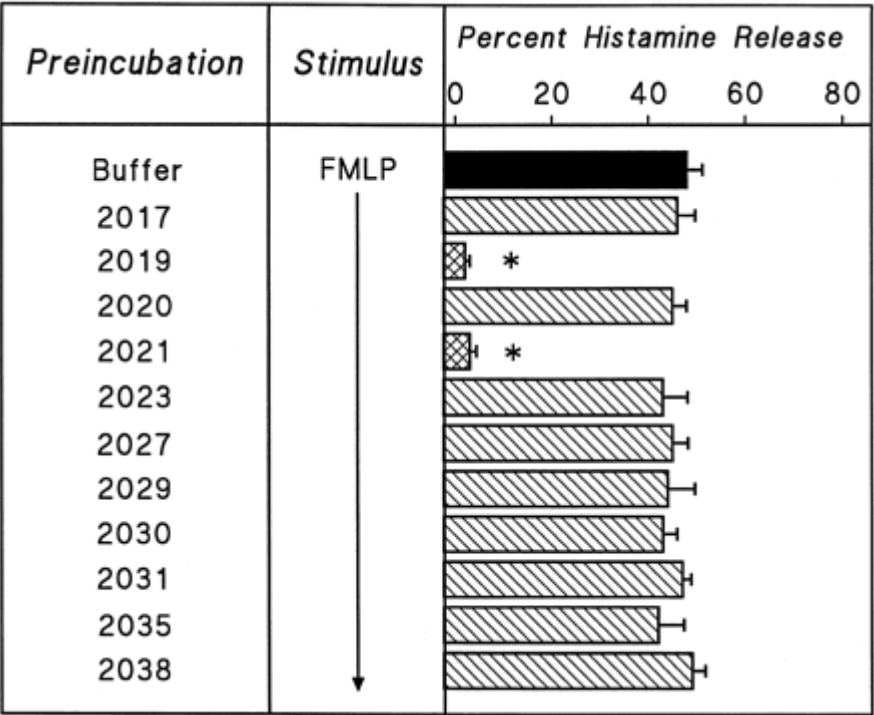


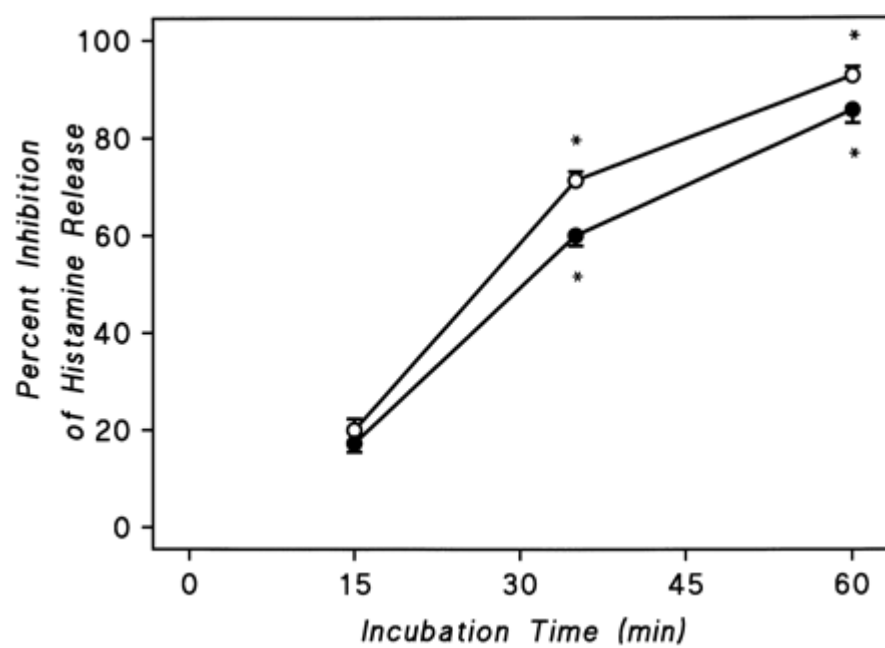
A

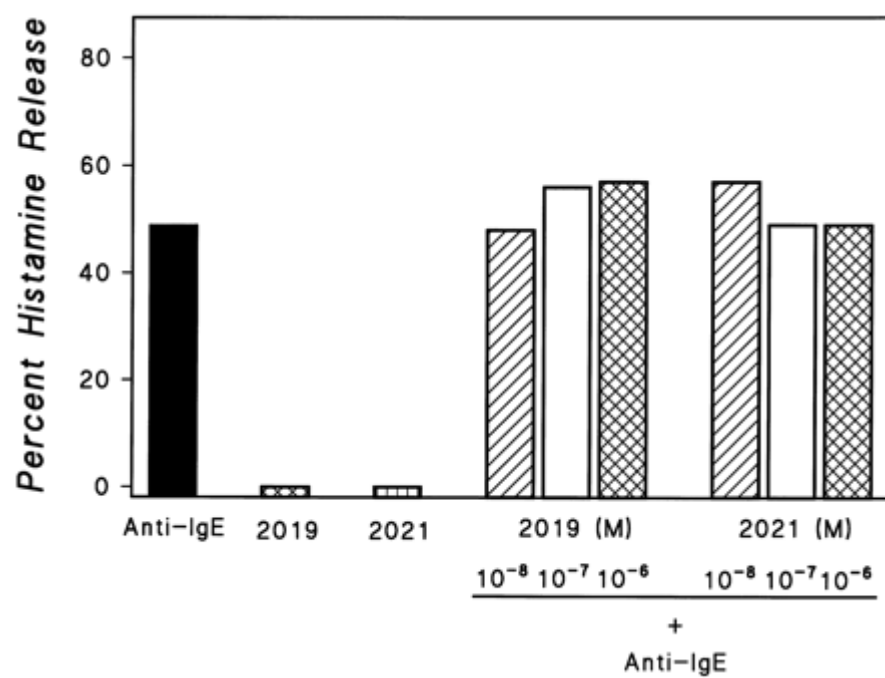


B

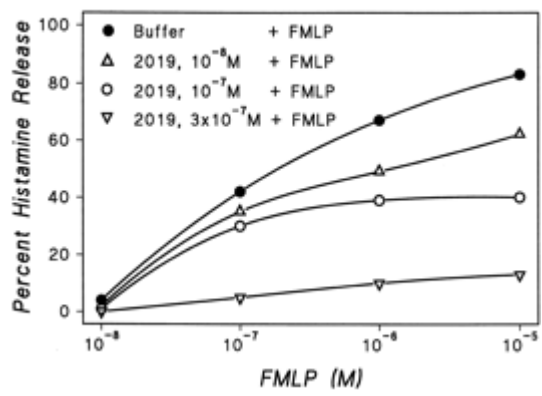




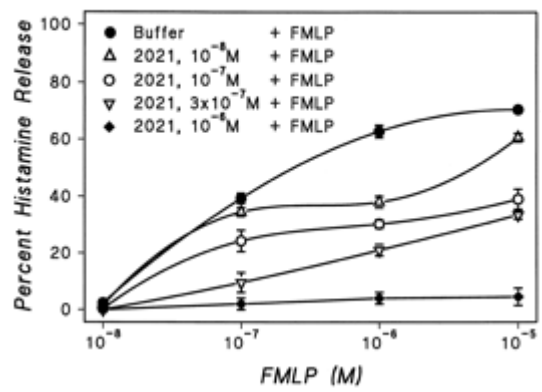


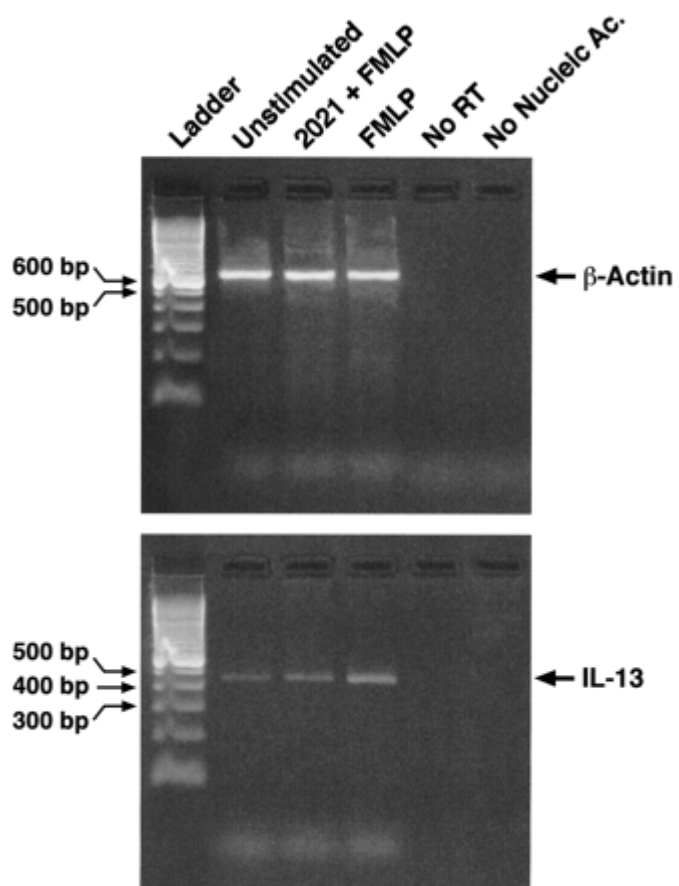


A

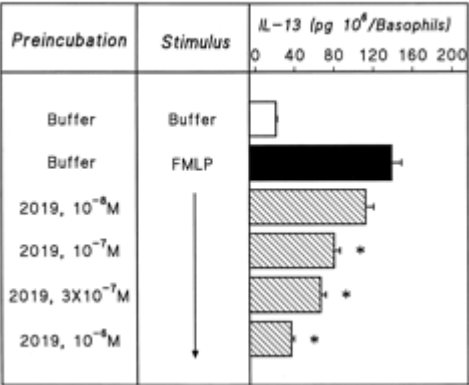


B

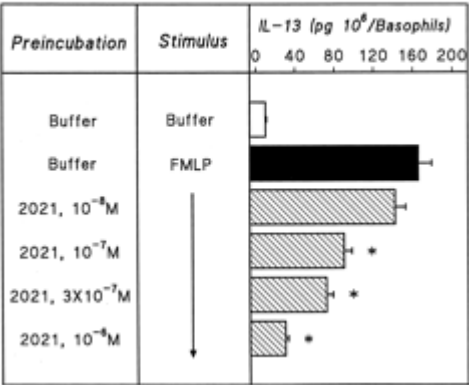


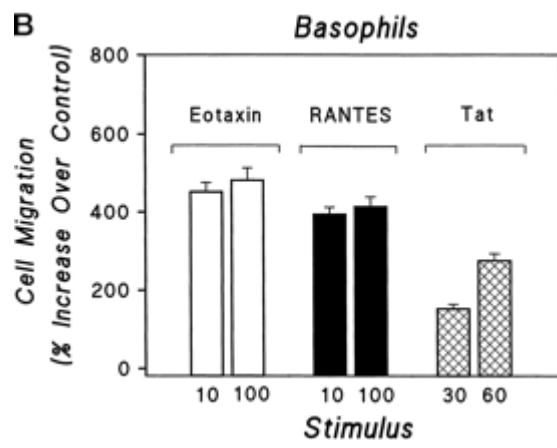
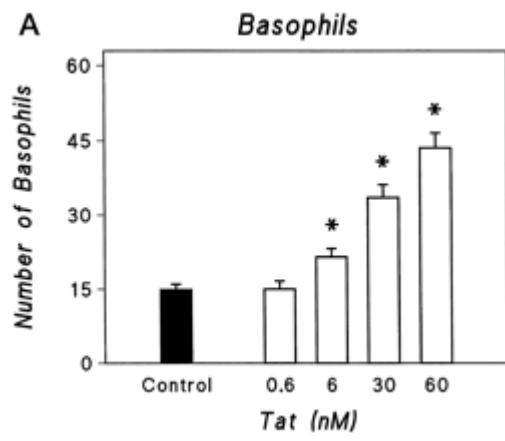


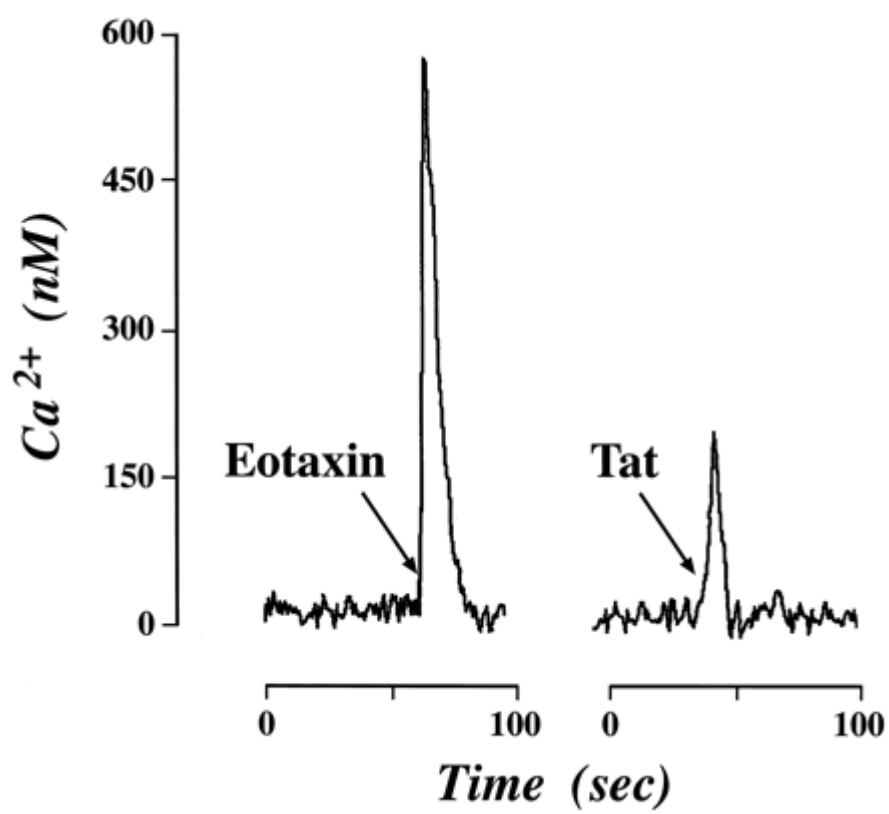
A



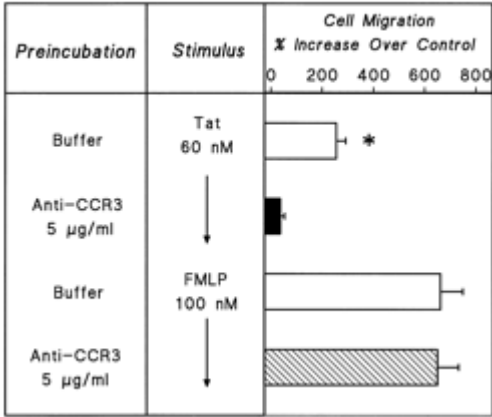
B



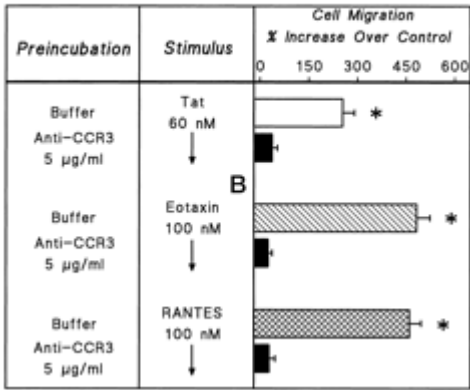


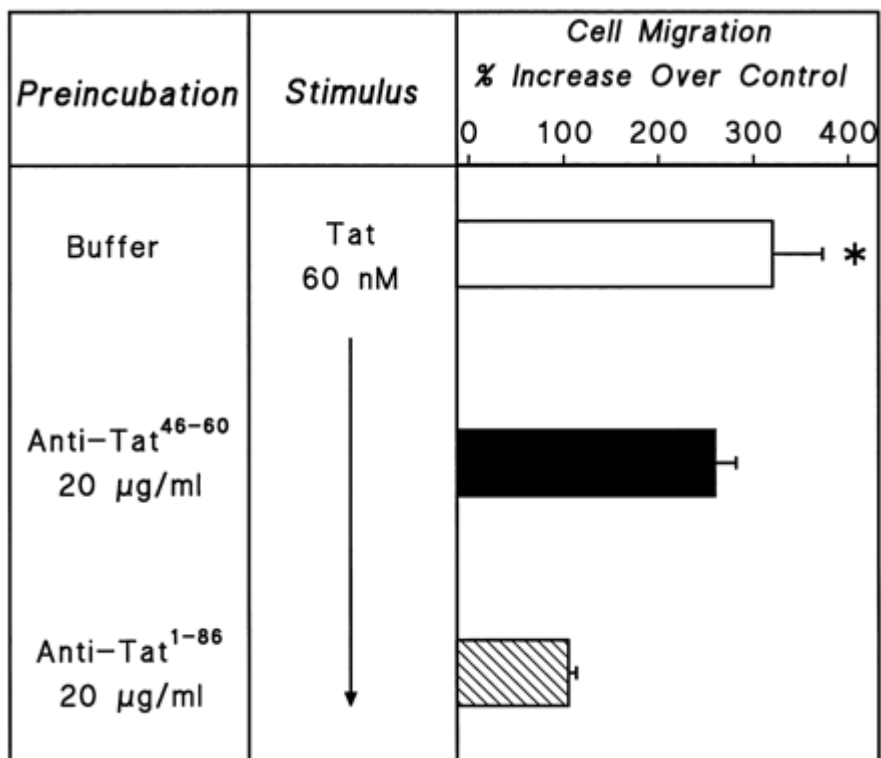


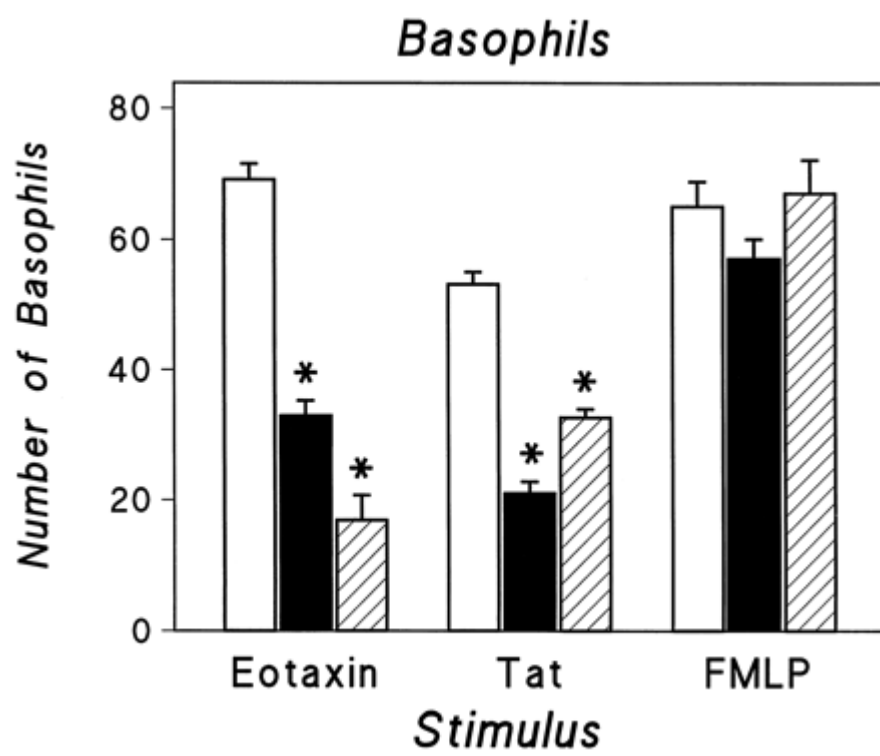
A

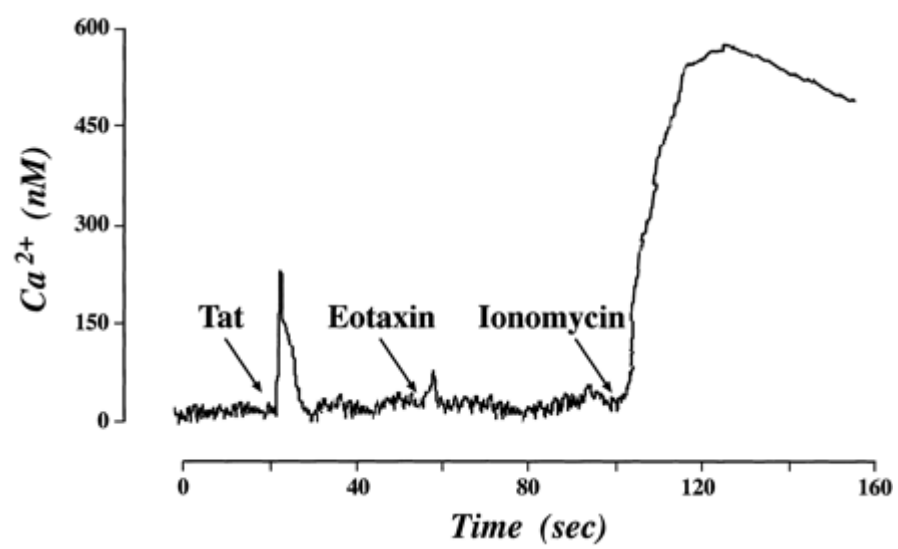


B

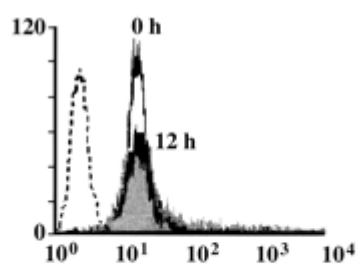




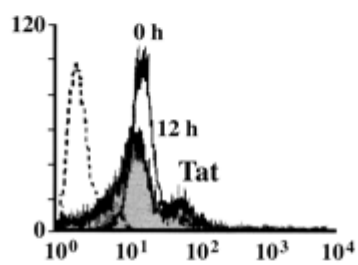




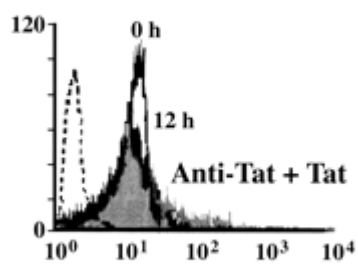
Relative Cell Number



(A)

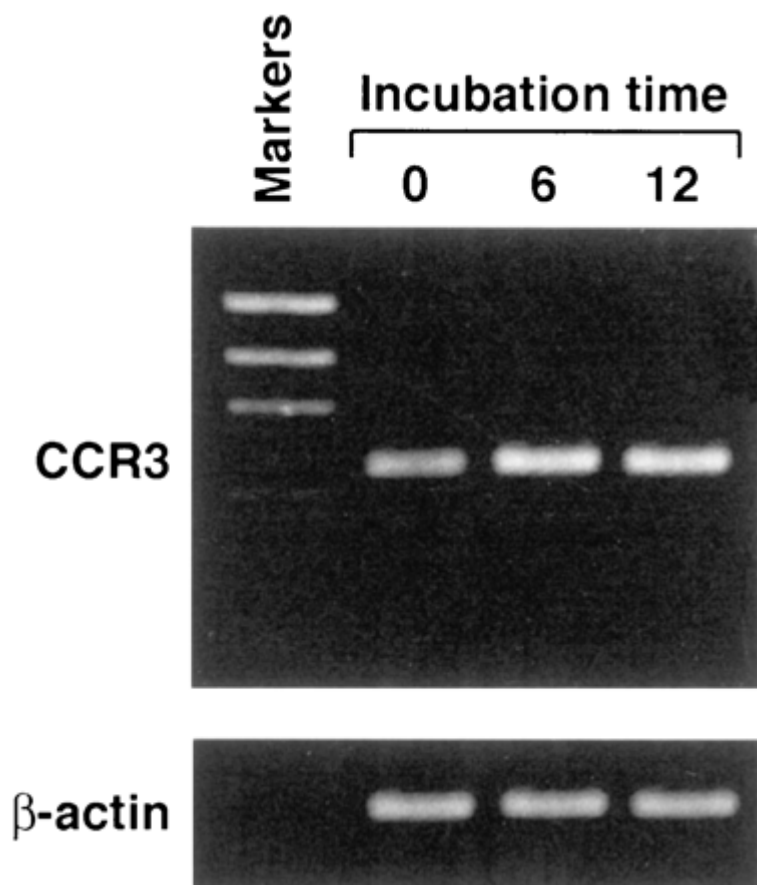


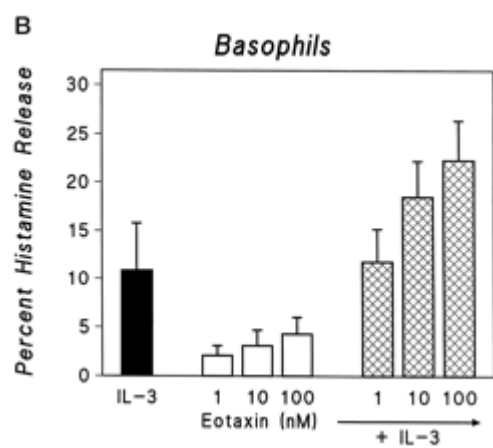
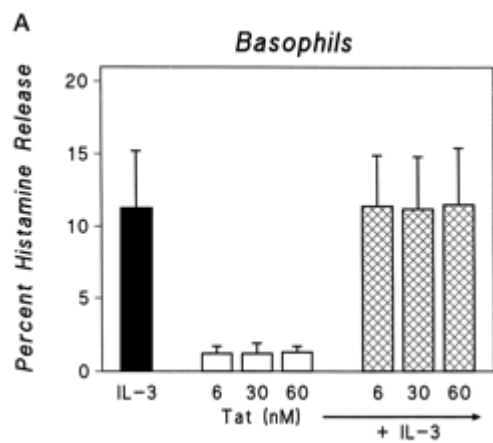
(B)



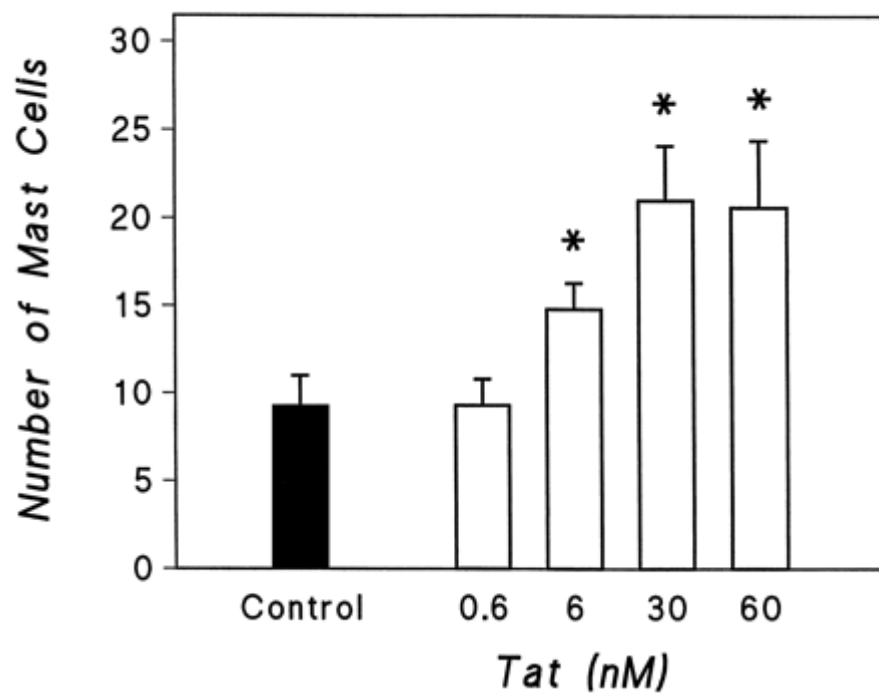
(C)

CCR3 Expression





Human Lung Mast Cells



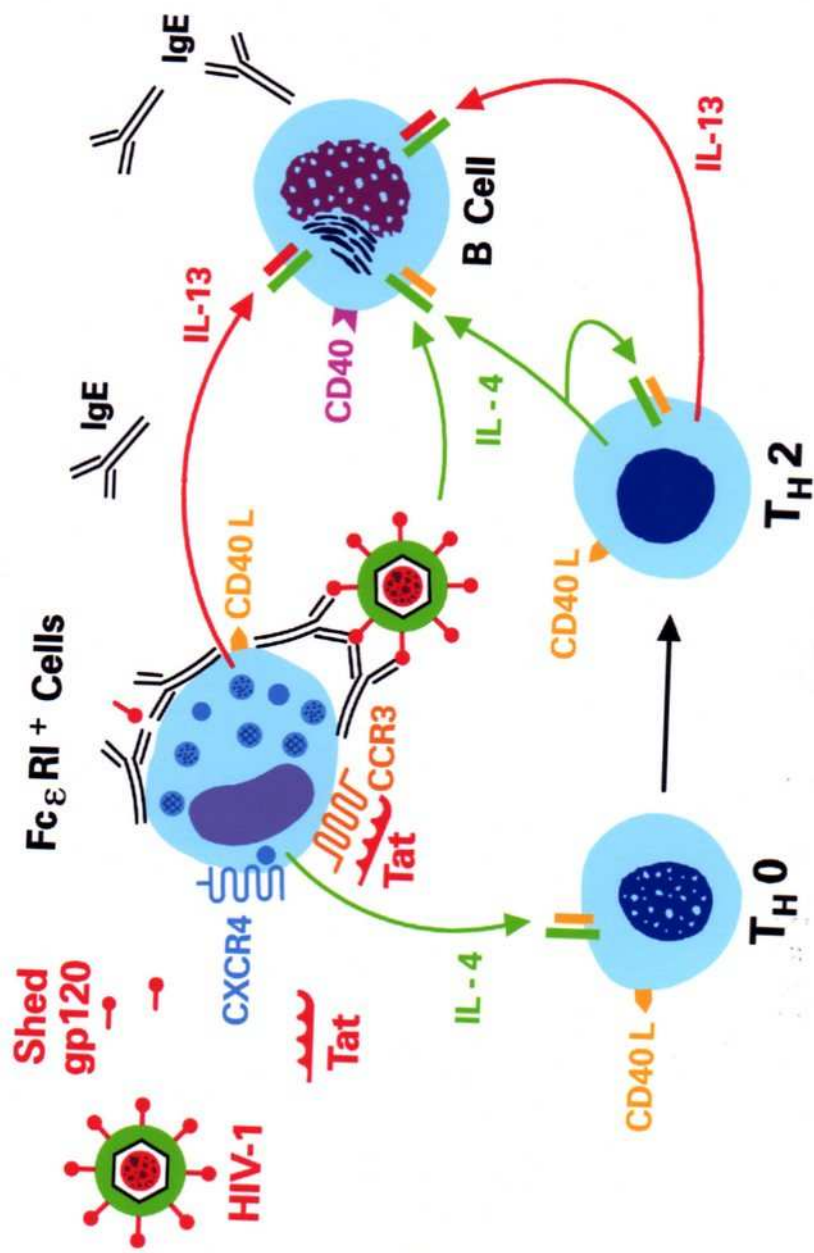


Tabella I. Glicoproteine gp120 ricombinanti derivanti da differenti cladi virali di varia origine geografica.

Proteina ricombinante dell'envelope	Tipo di gp120	Clade	Origine geografica	Sistema di espressione
gp120MN	MN	B	USA	Cellule di insetto
gp120SF2	SF2	B	USA	Cellule CHO
gp120LAV	LAV	B	Francia	Cellule di insetto
gp120CM	CM	E	Tailandia	Cellule di insetto

Tabella II. Sequenze peptidiche della gp120 di HIV-1_{MN}.

Peptide No.	Amino Acidi	Dominio della gp120	Sequenza
1922	31-50	C1	EKLWVTVYYGVPVWKEATT
1959	231-250	C2	LKCNDKKFSGKGSCKNVSTV
1960	241-260	C2	KGSCKNVSTVQCTHGIRPVV
1985	301-320	V3	CTRPNYNKRKRIHIGPGRAF
1988	331-350	C3	QAHCNISRAKWNDTLRQIV
1989	341-360	C3	WNDTLRQIVSKLKEQFKNK
2015	501-520	C5-gp41	TKAKRRVVQREKRAAIGALF

Tabella III. Sequenze peptidiche della gp41 di HIV-1_{MN}.

Peptide No.	Amino Acidi	Sequenza
2017	525-535	GAAGSTMGAAS
2019	541-560	QARLLLSGIVQQQNNLLRAI
2020	551-570	QQQNNLLRAIRAQQHMLQLT
2021	561-580	EAQQHMLQLTVWGIKQLQAR
2023	585-596	ERYLKDQQLLGF
2027	621-640	DDIWNNMTWMQWEREIDNYT
2029	641-660	SLIYSLLEKSQTQQEKNEQE
2030	651-670	QTQQEKNEQEELLELDKWASL
2031	661-680	LLELDKWASLWNWFDITNWL
2035	701-720	AVLSIVNRVRQGYSPLSLQT